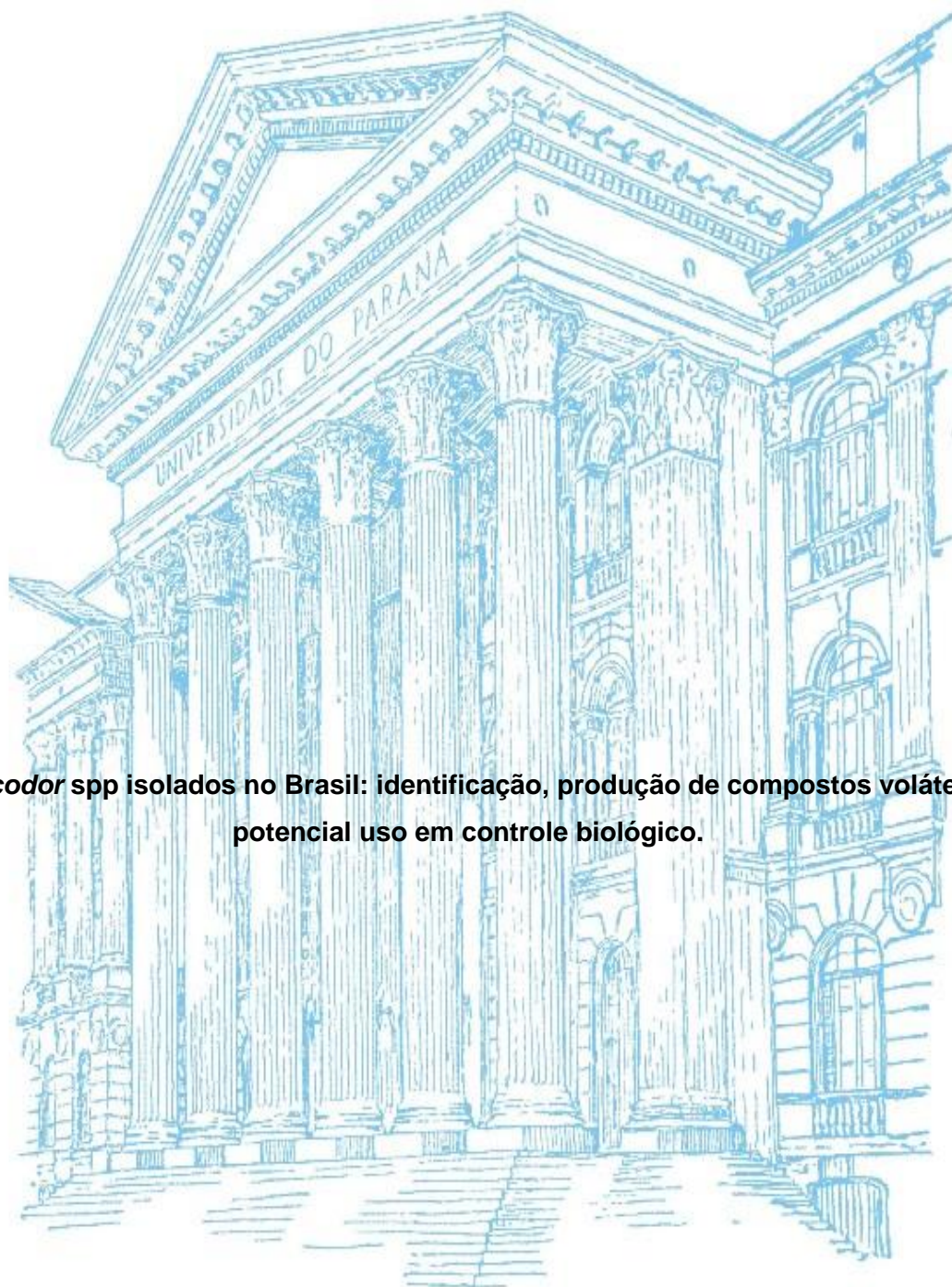


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORENA CAROLINA PEÑA



***Muscodor* spp isolados no Brasil: identificação, produção de compostos voláteis e potencial uso em controle biológico.**

CURITIBA

2014

LORENA CAROLINA PEÑA

***Muscodor* spp isolados no Brasil: identificação, produção de compostos voláteis e potencial uso em controle biológico.**

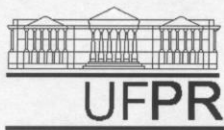
Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Genética pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Kava-Cordeiro

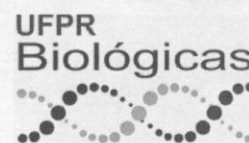
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke

CURITIBA

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LORENA CAROLINA PEÑA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de abril de 2014

Doutor João Alencar Pamphile
UEM – Membro Titular

Doutora Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. Química/UFPR – Membro Titular

Doutora Vanessa Kava-Cordeiro
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico esta dissertação à minha mãe Luiza
e ao meu pai Fernando.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Vanessa Kava-Cordeiro pela oportunidade, ensinamentos e incentivo em todos os momentos.

À co-orientadora Professora Dr^a. Chirlei Glienke pela prontidão em me auxiliar com conselhos e sugestões acerca da realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Lygia Vitória Galli-Terasawa pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

À Professora Dr^a. Patrícia Dalzoto por compor a minha banca de acompanhamento e cooperar com o desenvolvimento desse trabalho.

À banca de defesa da Dissertação, pelas sugestões, contribuições e correções do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética coordenado pelo Professor Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

Aos Professores do Departamento de Genética, que contribuíram para minha formação.

Ao Murilo Odilon Nichele Scroccaro secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética que sempre prontamente facilitou os trâmites de documentos e cumprimento de prazos.

Às amigas Tayane Schultz, Marcella Cesar, Renata Amorim, Carolina Mathias, Simone Fachin, Heloisa M. Brincas, pela amizade, aventuras, incentivo e pelo ombro amigo em várias ocasiões.

Às amigas inseparáveis Adriana Vasko e Vanessa Hauer pela dedicação em todos os momentos.

Aos amigos do LabGeM, Caroline Elise Waculicz-Andrade, Luís Fernando Jung, Lisandra Santos Ferreira, Daiani Cristina Savi, Ângela Cristina Ikeda, Juliana Marta Muehlmann Fischer, Camila Senkiv, Desirê Petters, Felipe Borges dos Santos, Alan Silva, Marcela Dias, Ana Paula Chiaverini que estiveram no dia a dia do laboratório e em diversas oportunidades puderam me auxiliar.

Ao André Servienski, que me auxiliou na montagem de diversos experimentos.

Ao Rodrigo Aluizio pelo trabalho em laboratório, ensinamentos e aos vários momentos de esclarecimento de dúvidas a respeito do trabalho, principalmente filogenia e estatística.

Ao Professor Dr. Fernando A. Sedor e ao biólogo Eduardo Shiichi Suzuki pela oportunidade de utilização de equipamentos e disposição em auxiliar no trabalho.

Aos Professores Dr. Ney Pereira Mattoso Filho e Dr^a. Célia Regina Cavichiolo Franco do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR pela oportunidade de utilização do microscópio eletrônico.

Aos técnicos do CME da UFPR, Rosangela Borges Freitas, Vera Regina Fontana Pionteke e Luiz Antônio Wambier Fialla pela ajuda na microscopia.

À professora Dr^a. Beatriz Helena Noronha e aos os alunos Ricardo Labes e Vinicius Annies do Departamento de Química da UFPR que me auxiliaram nas análises químicas.

À Professora Dr^a. Lupe Furtado Alle pela amizade de anos e pelas inúmeras conversas e conselhos nesse período.

Ao meu amigo e Professor Ms. Elias Karam Junior pelos ensinamentos, palavras de conforto, incentivo e sabedoria.

Ao amigo Dr. Luis Mauricio Graña Drummond pela ajuda na finalização do trabalho e apoio durante o mestrado.

Aos meus pais, Luiza Inês Wisniewski e Juan Fernando Peña que estiveram comigo durante todo o trajeto, sempre me apoiando e incentivando.

À minha tia Dr^a. Celina Wisniewski pela torcida e apoio.

À minha avó Izaura Nadvorny Wisniewski pelas orações e pelas belas e tranquilas palavras de carinho e sabedoria.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“Se descobéssemos o que estávamos fazendo, não
seria chamado de pesquisa, seria?”*

Albert Einstein

(A janela de Euclides - Leonard Mlodinow, 2010)

RESUMO

A citricultura é uma das principais atividades econômicas no Brasil. A presença de fungos fitopatogênicos ocasiona perda de produtividade e aumento do custo de produção devido ao uso de fungicidas. Com o objetivo inicial de selecionar fungos endofíticos de *Citrus sinensis* com potencial antagonista contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, foram obtidos 1141 isolados fúngicos de 443 folhas, representando 1% de um pomar no estado do Paraná, não afetado pela Mancha Preta dos Citros, doença causada por este fitopatógeno. Um isolado, identificado como *Muscodor* sp (LGMF1254), apresentou os melhores resultados no teste de antagonismo. Com o objetivo de selecionar outros isolados deste gênero, o isolado LGMF1254 foi utilizado na bioprospecção da planta medicinal Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Desta seleção foi obtido mais um isolado (LGMF1255), sendo estes dois os primeiros descritos no Brasil do gênero *Muscodor*. Fungos do gênero *Muscodor* são considerados uma promessa no controle biológico pela produção de compostos orgânicos voláteis (COVs). Esses dois isolados apresentaram antagonismo contra *P. citricarpa* pela produção de COVs. Os compostos majoritários foram identificados como Thujopseno e Ácido benzenodicarboxílico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A identificação e a caracterização dos isolados foram baseadas em macromorfologia, micromorfologia por microscopia eletrônica de varredura e sequenciamento parcial das regiões ITS1-5.8S-ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal e do gene *rpb2* (*RNA polymerase II*). Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram identidade absoluta de ITS com *M. sutura* e *M. vitigenus*. Com a sequência do gene *rpb2* não foi possível diferenciar os isolados LGMF1254 e LGMF1255, porém estes apresentaram diferenças quando comparados com a mesma sequência de *M. sutura*. A sequência do gene *rpb2* de *M. vitigenus* não está disponível em bancos de dados. Na análise dos resultados, estes primeiros isolados identificados no Brasil receberam a denominação de *Muscodor vitigenus* latu sensu, pois *M. vitigenus* é a espécie mais antiga deste clado.

Palavras chave: *Xylareaceae*, *Muscodor*, *Citrus sinensis*, *Schinus terebinthifolius*, *Phyllosticta citricarpa*, controle biológico, compostos orgânicos voláteis, sequenciamento de DNA, fungo endofítico, fungo fitopatogênico.

ABSTRACT

The citrus cultivation is one of the main economic activities in Brazil. The presence of phytopathogenic fungi causes lost productivity and production's cost increase, due to the use of fungicides. With the initial goal of selecting *Citrus sinensis* endophytic fungi with antagonistic potential against the phytopathogenic *Phyllosticta citricarpa*, was obtained 1141 fungical isolates of 443 leaves, representing 1% of a Paraná orchard unaffected by the Citrus Black Spot, an illness caused by this phytopathogen. An isolate, identified as *Muscodor* sp (LGMF1254), presented the best results in the antagonism test. With the aim of selecting other isolates of the same genus, this isolate was used in the Aroeira medicinal plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) bioprospection. Another isolate (LGMF1255) was obtained in this prospection, being both of them the very first of the *Muscodor* genus described in Brazil. *Muscodor* genus fungi are considered a promise in biological control via the production of volatiles organic compounds (VOC's). This two isolates presented antagonism against *P. citricarpa* by means of the production of VOC's. Using gas chromatography and mass spectrometry, the main compounds were identified as Thujopsene and Benzenedicarboxylic acid. The identification and the characterization of the isolates were based on macromorphology, micromorphology by means of electronic microscopy scanning and regions sequencing ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer) of the ribosomal DNA and the *rpb2* (RNA polymerase II) gene. The LGMF1254 and LGMF1255 isolates presented absolute ITS identity with *M. sutura* and *M. vitigenus*. With the *rpb2* gene sequence it was not possible to differentiate the LGMF1254 and LGMF1255 isolates, nevertheless, both presented differences when compared to the same sequence of *M. sutura*. The *rpb2* de *M. vitigenus* gene sequence is not available in databases. In the results analysis, these first isolates received, in Brazil, the designation of *Muscodor vitigenus* *latu sense*, since *M. vitigenus* is the oldest species of this clade.

Keywords: *Xylareaceae*, *Muscodor*, *Citrus sinensis*, *Schinus terebinthifolius*, *Phyllosticta citricarpa*, biological control, volatiles organic compounds, DNA sequencing, endophytic fungi, phytopathogenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Laranja doce com sintoma da Mancha Preta dos Citros.....	31
FIGURA 2: Macromorfologia dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 em cultura pareada.	53
FIGURA 3: Árvore filogenética do alinhamento de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA.....	54
FIGURA 4: Região de variação de parte da sequência do gene rpb2 dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e M.sutura.....	55
FIGURA 5: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do alinhamento de sequências do gene rpb2 dos isolados de Muscodor.....	55
FIGURA 6: Inibição do fungo <i>Phyllosticta citricarpa</i> pelos voláteis do isolado LGMF1254....	57
FIGURA 7: Crescimento micelial do fungo <i>Phyllosticta citricarpa</i> após 45 dias a 25°C	58
FIGURA 8: Ação dos compostos voláteis produzido pelo fungo Muscodor (LGMF1254) contra o fungo <i>Phyllosticta citricarpa</i> (LGMF06) após 15 dias.....	59
Figura 9:Macromorfologia do isolado LGMF1254 em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.....	62
Figura 10:Macromorfologia do isolado LGMF1255 em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.....	63
Figura 11: Macromorfologia do isolado M. sutura em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.....	64
Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura do isolado LGMF1254.	65
Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura do isolado LGMF1255.....	66
Figura 14: Cromatografia gasosa comparativa entre duas análises independentes (Rosa e Preta) dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254.....	67
Figura 15: Cromatografia gasosa comparativa entre duas análises independentes (Rosa e Preta), com ênfase no composto majoritário Thujopseno	67
Figura 16:Espectrometria de massas comparando as amostras com a Biblioteca NIST	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Área das colônias em centímetros quadrados ao longo de 45 dias de crescimento micelial	58
Gráfico 2:Área de crescimento das colônias dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e M. sutura a 23 e 28°C após 10 dias de incubação	60

Lista de quadros

Quadro 1: Características de algumas espécies de Muscodor.....	40
Quadro 2 Hospedeiro, Localização, dados do GenBanK e compostos voláteis produzidos por fungos do gênero Muscodor	56
Quadro 3: Compostos orgânicos Voláteis produzidos pelo Muscodor, isolado LGMF1254 e LGMF1255.....	69

Lista de siglas

Atm: Atmosfera

BDA: Meio Batata Dextrose e Ágar

COV: Compostos orgânicos voláteis

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FRAC- *Fungicide Resistance Action Committee*

IAC: Instituto Agronômico de Campinas

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

LabGeM: Laboratório de Genética de Microrganismos

LSD: *Least Square difference*

MEA: *Malt Extract Agar*

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MPC: Mancha Preta dos Citros

ng: Nanogramas

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pmol: Picomole

q.s.p: Quantidade suficiente para

rDNA: DNA ribossomal

RNA: Ácido ribonucleico

TBE: Tampão Tris, Ácido bórico, EDTA

Sumário

1	INTRODUÇÃO	28
2	OBJETIVOS	29
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1	Citricultura e suas enfermidades	29
3.2	<i>Phyllosticta citricarpa</i> e a Mancha Preta dos Citros	30
3.3	Controle de doenças fúngicas pós-colheita em citros	32
3.4	Controle biológico	34
3.5	Microrganismos endofíticos	35
3.6	Fungos produtores de compostos orgânicos voláteis	37
3.7	Identificação dos compostos orgânicos voláteis	39
3.8	Fungo endofítico do gênero <i>Muscodor</i>	39
3.9	Identificação de fungos por morfologia e sequenciamento de DNA	41
4	Capítulo 1: Artigo a ser submetido à revista <i>Fungal Ecology</i>, qualis B1 em Ciências Biológicas I	43
	RESUMO:	44
	ABSTRACT	45
	INTRODUÇÃO	46
	MATERIAL E MÉTODOS	46
	Isolamento de fungos endofíticos do gênero <i>Muscodor</i>	46
	Identificação dos isolados por sequenciamento da região ITS e RPB2	47
	Avaliação da atividade de antagonismo dos isolados de <i>Muscodor</i> contra o fungo <i>Phyllosticta citricarpa</i>	49
	Antagonismo dos isolados de <i>Muscodor</i> contra o fitopatógeno <i>Phyllosticta citricarpa</i>	49
	Avaliação da atividade antifúngica dos compostos voláteis produzidos pelo isolado de <i>Muscodor</i> , LGMF1254	49
	Avaliação da ação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo LGMF1254 sobre a produção de picnídios do fitopatógeno <i>Phyllosticta citricarpa</i>	49
	Avaliação comparativa do crescimento micelial do isolado LGMF1254, LGMF1255 e <i>M. sutura</i> em diferentes temperaturas	50
	Avaliação de crescimento micelial dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e <i>M. sutura</i> em diferentes meios de cultura	50
	Microscopia Eletrônica de Varredura	51
	Caracterização dos compostos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255	51
	RESULTADOS	52

Isolamento dos fungos endofíticos	52
Identificação por PCR e sequenciamento	53
Metodologias de avaliação de antagonismo dos isolados de <i>Muscodor</i> contra o fungo <i>P. citricarpa</i>	57
Antagonismo dos isolados de <i>Muscodor</i> contra o fitopatógeno <i>Phyllosticta citricarpa</i> ...	57
Avaliação da atividade antifúngica dos compostos voláteis produzidos pelo isolado de <i>Muscodor</i>	57
Avaliação da ação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo LGMF1254 na produção de picnídios do fitopatógeno <i>Phyllosticta citricarpa</i>	58
Avaliação comparativa do crescimento micelial do isolado LGMF1254, LGMF1255 e <i>M. sutura</i> em diferentes temperaturas.....	59
Crescimento micelial dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e <i>M. sutura</i> em diferentes meios de cultura	60
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
Caracterização dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255 do gênero <i>Muscodor</i>	67
DISCUSSÃO	69
5 DISCUSSÃO GERAL	74
6 CONCLUSÃO	79
7 REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é destaque na citricultura mundial, com uma das maiores produções de laranja. O país é o segundo maior produtor mundial com 20 milhões de toneladas produzidas em 2010 (FAO, 2012). Entre os estados com maior produção no país estão São Paulo, Bahia, Paraná, Minas Gerais e Sergipe (EMBRAPA, 2014).

No entanto, todos os anos, milhões de caixas de laranja são perdidas no mundo. A perda de produtividade é principalmente ocasionada pela presença de pragas e doenças que acometem citros. Doenças como o *greening* podem comprometer o pomar e outras como a Mancha Preta dos Citros (MPC) e o Bolor verde comprometem principalmente o fruto (NEVES *et al.*, 2010).

A MPC, causada pelo fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa*, causa lesões características em frutos ainda na planta ou após serem colhidos. Estes frutos podem enfrentar barreira fitossanitária inviabilizando a exportação *in natura* para o mercado europeu. Em pomares muito afetados, esta doença causa queda prematura dos frutos, gerando um grande prejuízo econômico. Como doença de pós-colheita, o Bolor verde causado pelo fungo *Penicillium digitatum*, gera perdas no armazenamento e transporte, afetando também a produtividade (NEVES *et al.*, 2010).

O controle dessas doenças vem sendo feito por fungicidas no período de floração da plantação. Porém, o constante uso destes pode selecionar patógenos resistentes e afetar, além da produção e qualidade dos frutos, o ambiente e a saúde humana.

Como alternativa aos agroquímicos, microrganismos têm sido utilizados no controle biológico. Microrganismos endofíticos, que habitam o interior das plantas sem causarem doenças e sem produzirem estruturas externas visíveis, disputam espaço e nutrientes com fitopatógenos. Por este motivo e também por produzirem metabólitos secundários, apresentam grande potencial de uso em controle biológico. Fungos endofíticos como os do gênero *Muscodor*, que produzem compostos antimicrobianos voláteis, apresentam um grande potencial de uso, principalmente no armazenamento e transporte do produto vegetal, como os frutos de citros.

O presente trabalho teve o propósito de isolar, identificar e caracterizar, no Brasil, os primeiros isolados de fungos endofíticos do gênero *Muscodor* com ação antimicrobiana, especialmente contra o fitopatógeno *P. citricarpa*.

2 OBJETIVOS

- Isolar fungos endofíticos do gênero *Muscodor* com potencial uso no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa*.
- Caracterizar dois isolados do gênero *Muscodor* por macromorfologia, microscopia eletrônica de varredura, e sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e parcial do gene *rpb2*.
- Identificar compostos orgânicos voláteis de *Muscodor* spp. com potencial ação antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Citricultura e suas enfermidades

A citricultura é uma das mais importantes práticas econômicas no mundo. O cultivo dessas árvores frutíferas atualmente tem sido feito por mais de 130 países nas zonas tropicais e subtropicais do globo, sendo países do sul da União Europeia, especialmente a Espanha, a China, o México, a Índia, os Estados Unidos e principalmente o Brasil, os locais de maior produção. O Brasil além de grande produtor citrícola, especialmente quanto a produção de laranja, é o principal produtor de suco de laranja (NEVES *et al.*, 2010).

Os cítricos são afetados tanto por pragas importantes como por doenças causadas por nematódeos, fungos, bactérias, vírus, viróides e por doenças de etiologia desconhecida. Algumas destas se encontram localizadas em áreas geográficas específicas, como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, em São Paulo e em determinadas zonas citrícolas da América Central, e o Cancro Cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que afeta a maioria das variedades e se encontra amplamente expandida pelas

áreas citrícolas da Flórida e da maioria dos países sul-americanos (TIMMER; GERNSEY; GRAHAM, 2010).

Existem doenças que foram localmente importantes e que em tempos recentes se propagaram por outras zonas citrícolas, como é o caso do *Greening*, causado pela bactéria *Candidatus liberibacter* sp, que afeta a todos os genótipos cítricos e em geral a todas as espécies da subfamília *Aurantoidea*, da família Rutaceae (TIMMER; GERNSEY; GRAHAM, 2010).

Outras doenças de ocorrência frequentes em citros são a Mancha Preta dos Citros e o Bolor verde, causadas pelos fungos *Phyllosticta citricarpa* e *Penicillium digitatum* respectivamente. Essas doenças comprometem diretamente o comércio de frutos *in natura* tanto dentro como fora do país, afetando a exportação, já que atinge tipos diferentes de citros, gerando perdas econômicas significativas (PLAZA *et al.*, 2003).

3.2 *Phyllosticta citricarpa* e a Mancha Preta dos Citros

A Mancha Preta dos Citros (MPC), também conhecida como Pinta Preta, acomete cítricos de grande importância econômica como a laranja doce (*Citrus sinensis*), limões verdadeiros (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), tangerinas e seus híbridos. Os sintomas da doença são aparentes em folhas, pecíolos, ramos, espinhos, pedúnculos e principalmente nos frutos (KIMATI; BERGAMIN; AMORIM, 2005).

Frutos com MPC apresentam lesão na casca restrita ao flavedo, não alterando a qualidade dos mesmos para a produção de suco concentrado. Porém, as lesões levam os frutos a se tornarem depreciados no mercado de frutas frescas. A doença em pomares muito afetados está relacionada com a queda prematura dos frutos, o que ocasiona também a diminuição da produtividade (FEICHTENBERGER, 1996).

As lesões na casca dos citros em geral, apresentam uma depressão no centro com cor marrom claro a acinzentado e ao redor um halo verde circundando a lesão. As bordas da lesão são de coloração marrom escuro e salientes, podendo apresentar no centro pontos pretos, os picnídios, ainda que os ascósporos não sejam observados; as lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação; frutos colhidos e infectados, apesar de não apresentarem sintomas visíveis, podem

desenvolvê-los durante o transporte ou armazenamento (KOTZÉ, 1981, FEICHTENBERGER, 1996).



FIGURA 1: Laranja doce com sintoma da Mancha Preta dos Citros.
Fonte: o autor

O fungo *Phyllosticta citricarpa* (GLIENKE *et al.*, 2011), anteriormente nomeado como *Guignardia citricarpa*, é um ascomiceto, pertencente à família *Phyllostictaceae*. Esse microrganismo é o fitopatógeno causador da doença Mancha Preta dos Citros, que foi descrita pela primeira vez por Kiely em 1895 apud Timossi *et al.*, 2003, ocorrendo originalmente na Austrália, se espalhando por vários lugares no mundo como Moçambique, China, Taiwan, Japão, Indonésia, Argentina e Peru (SUTTON; WATERSON, 1966).

No Brasil a doença apareceu em Piracicaba, no interior do estado de São Paulo, em 1940 (AVENA-SACCÁ *et al.*, 1940), se alastrando para vários estados do Sul e Sudeste (FEICHTENBERGER, 1996), causando muitos danos na produção de laranja. O primeiro registro no Paraná ocorreu em 2006, em tangerinas 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenora), na região do Vale do Ribeira (NUNES, 2006).

O ciclo da MPC pode ocorrer de duas maneiras distintas: através dos picnidiósporos ou conídios (esporos assexuais) ou por meio dos ascósporos (esporos sexuais). Os picnidiósporos, encontrados em frutos sintomáticos, folhas caídas e ramos mortos são responsáveis pela infecção à curta distância, sendo disseminados pela água da chuva, orvalho ou irrigação. Os ascósporos são encontrados em folhas

caídas e em decomposição, sendo responsáveis pela infecção tanto à longa quanto à curta distância por serem dispersados principalmente pelo vento (ROBBS; BITTENCOURT, 1995, FEICHTENBERGER *et al.*, 1996).

O controle da MPC se dá com a retirada das folha e ramos caídos para redução da proliferação e germinação de ascósporos e conídios. Além das medidas culturais esperadas em campo, o controle químico é necessário (SILVA-PINHATI *et al.*, 2009). Os fungicidas têm recomendações de serem pulverizados nos períodos de suscetibilidade dos frutos e períodos críticos de infecções (STAMMLER *et al.*, 2013). Segundo dados de Stammler e colaboradores recomenda-se para *Phyllosticta citricarpa* o uso do fungicida azoxistrobina (azoxystrobin), para o qual o fitopatógeno não apresenta resistência, mesmo em concentrações baixas.

3.3 Controle de doenças fúngicas pós-colheita em citros

O tratamento usual para as doenças fúngicas que acometem os citros e que vem sendo usado há décadas envolve o uso de fungicidas. Estes são distribuídos em duas categorias: protetores e sistêmicos e têm esta denominação em função do seu modo de ação (SANTOS, 2012).

Os protetores, também denominados de curativos, erradicam patógenos crescentes, próximo às superfícies visíveis dos frutos e plantas. Exercem uma barreira tóxica, prevenindo a penetração de fungos pela inibição do processo de germinação dos esporos. Desta forma, os fungicidas protetores visam o hospedeiro e não o patógeno (BERGAMIN; KIMATI, 1995, SANTOS, 2012).

Os fungicidas sistêmicos ou erradicantes tem o princípio ativo absorvido pela planta e a ação do agroquímico, vai além do local da aplicação, é disseminado na planta. A aplicação dos sistêmicos pressupõe a possibilidade de uso depois de ocorrida a doença. No entanto, devem ser tomadas as devidas precauções e medidas de controle de acordo com cada caso em particular, dependendo da doença, tempo de desenvolvimento da mesma e extensão tomada nos cultivares (BERGAMIN; KIMATI, 1995, SANTOS, 2012).

Os fungicidas mais conhecidos e comumente utilizados são do grupo dos benzimidazóis e imazalil. Esses têm diferentes modos de ação, os fungicidas pertencentes ao primeiro grupo caracterizam-se por interferir na mitose e meiose das células e os do grupo imazalil inibem a reação de demetilação (DMI) (BERGAMIN;

KIMATI, 1995, SANTOS, 2012).

No entanto, fungos com alterações genéticas que acabam por deixá-los resistentes aos agroquímicos podem ser selecionados, o que se torna muito comum quando o uso desses produtos é feito durante décadas e de forma contínua, como tem sido feito nas casas de armazenamento de frutos cítricos para o controle de patógenos de pós-colheita (RODRIGUES *et al.*, 2007; FISCHER *et al.*, 2011).

Segundo dados do FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*), os fungicidas empregados atualmente para controle da MPC tendem a gerar certa resistência que, com o uso contínuo, pode acelerar o processo de resistência e diminuir pela metade a eficiência do fungicida (<http://www.frac.info>). Testes *in vitro* já comprovaram o aparecimento de linhagens de *P. citricarpa* mais resistentes aos fungicidas usualmente utilizados (POSSIEDE *et al.*, 2009). Segundo trabalho de Stammler *et al.*, (2013), uma alternativa ao fungicida carbendazim, utilizado durante décadas nas culturas de *Citrus sinensis* contra a Mancha Preta dos Citros, e agora proibido na agricultura, é um outro fungicida, o azoxistrobina, ao qual a *P. citricarpa* não apresenta resistência.

A constante aplicação desses fungicidas, em doses e períodos irregulares, tem sido questionado levantando a hipótese de causar risco à saúde humana pelas altas concentrações desses tóxicos presentes nos frutos e no ambiente (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; FISCHER *et al.*, 2011). Sendo assim, a utilização de outros possíveis métodos para controle dos patógenos, menos danosos, como o controle biológico, se faz necessário.

O controle biológico, também denominado de biocontrole na fitopatologia, é uma medida de contenção de um fitopatógeno e supressão de danos causados por ele devido a atividade de outros organismos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Geralmente microrganismos antagonistas são inimigos naturais, e já foram relatados como sendo efetivos (PAL; MCSPADDEN, 2006, GUETSKY *et al.*, 2002). O sistema de antagonismo é, portanto, resultante da interação e interferências causadas por três protagonistas: o hospedeiro, o patógeno e o antagonista que seria o responsável pelo controle biológico de fato (COOK; BAKER, 1983, BETTIOL, 1991). Esposito; Azevedo (2010), ainda ressaltam que entre os microrganismos mais promissores para o controle biológico estão os fungos entomopatogênicos e os fungos endofíticos.

3.4 Controle biológico

Para atender a demanda de produtos alimentícios livres de resíduos dos agroquímicos e a preocupação com o ambiente, o controle biológico de pragas e doenças passou a ter lugar na agricultura. No Brasil, os primeiros bioinseticidas surgiram em 1950 e os primeiros produtos de controle microbiano de doenças de plantas, com ação antagonista, ocorreram no início da década de 90 (BETTIOL *et al.*, 2009).

A utilização de microrganismos (fungos, bactérias, vírus, predadores e parasitoides) no controle de pragas, patógenos e ervas daninhas tem sido uma forma de redução e alternativa aos agroquímicos e as consequências do seu uso constante (LI *et al.*, 2012). Autores ressaltam que entre os organismos mais promissores para controle biológico estão os fungos entomopatogênicos e os fungos endofíticos (ESPOSITO, AZEVEDO, 2010).

Os mecanismos de biocontrole envolvem diversos tipos de interações antagonistas. Na competição e no parasitismo os organismos competem por espaço e nutrientes, o que caracterizaria um mecanismo indireto de biocontrole (MELO; AZEVEDO 1998). Na interação de competição o agente controlador é capaz de crescer de maneira mais eficiente do que o patógeno no local da infecção. No parasitismo um organismo parasita, obtém todo ou parte do alimento às custas do hospedeiro. Na antibiose, outro tipo de interação, organismos secretam metabolitos antibióticos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de organismos de outra espécie (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2010). Exemplo bem sucedido de agente de controle biológico são fungos do gênero *Trichoderma* cuja utilização acarreta uma redução significativa dos efeitos causados pelos fitopatógenos *Rhizoctonia* e *Fusarium oxysporum* em culturas de algodão (BASIM; OZTORK; YEGEN, 1999). Na indução de resistência em plantas, pela presença de agentes externos abióticos e principalmente bióticos, também os resultados são positivos, como na inoculação do fungo do gênero *Trichoderma* em raízes de pepino, que promovem atividade enzimática capaz de degradar outros fungos em raízes e folhas (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2010).

Como mecanismo de controle biológico também há a premunização, exclusivo de vírus que consiste na proteção de uma planta contra um vírus pela colonização

antecipada dessa planta por uma estirpe fraca do mesmo vírus (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2010).

Diferentes espécies de fungos tem sido prospectadas para uso no controle de patógenos humanos e de fitopatógenos. Muitos destes são produtores de metabólitos secundários, como os compostos orgânicos voláteis que agem de alguma forma, embora nem sempre compreendida, no desenvolvimento dos patógenos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002, EZRA; STROBEL, 2003, AMIN *et al.*, 2010, GAJERA *et al.*, 2013). Espécies de fungos do gênero *Muscodor* apresentam ação de inibição a diversos patógenos, bactérias e fungos, sejam eles humanos, como por exemplo *Escherichia coli*, *Candida albicans*, ou vegetais como *Rhizoctonia solani* e *Aspergillus fumigatus* (DAISY *et al.*, 2002, STROBEL, 2011).

3.5 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos foram descritos inicialmente por Bary em 1866, aplicando o termo à flora microbiana interna de tecidos vegetais. Em 1986, Petrini propôs uma ampliação do termo endofítico; incluindo todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, capazes de colonizar, em alguma fase do ciclo de vida, os tecidos da planta sem causar sintomas. Em 1992, Kloepper e Beuchamp se referiram aos endofíticos como “microrganismos que ocorrem no interior dos tecidos de plantas e aparentemente não causam sintomas de doenças ao hospedeiro”.

Nesse mesmo contexto Neto, Azevedo e Araújo (2002), acabam definindo que endofíticos são aqueles capazes de passar todo ou uma parte de seu ciclo de vida colonizando entre e/ou intracelularmente os tecidos do hospedeiro, sem causar sintomas aparentes de doença. Desconsideram micorrizas e bactérias nodulantes, porém incluem como endofíticos microrganismos de difícil manipulação em laboratório, tendo sua identificação apenas por técnicas moleculares. Mendes e Azevedo (2007) classificam também os endofíticos em dois tipos: microrganismos endofíticos do tipo I, que são incapazes de produzir estruturas externas visíveis e os do tipo II que seriam capazes de produzir estas estruturas.

Alguns cuidados devem ser tomados para que os fungos endofíticos sejam isolados. A desinfestação superficial da folha é etapa fundamental para o processo de isolamento, para que os fungos epifíticos, que habitam somente a parte área das

folhas não sejam também isolados. Os tempos de tratamento e concentração dos agentes desinfetantes podem variar, dependendo do tipo de material a ser utilizado para tal procedimento, sendo necessário uma bateria de testes para adaptação deste protocolo (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002). Temperatura de isolamento, meios de cultura e até o auxílio de substâncias seletivas, como antibióticos, fungicidas ou até outros microrganismos com alguma capacidade de inibição ou de seleção de determinados fungos, são outras variáveis passíveis de serem controladas para uma melhor obtenção dos fungos de interesse (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002, WORAPONG *et al.*, 2002).

O estudo dos endofíticos foi intensificado quando o potencial destes na produção de metabólitos de interesse econômico foi descoberto (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002). Embora as interações entre endofíticos e plantas não sejam ainda bem compreendidas, sabe-se que estas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002, AZEVEDO, 2008) e que nestas interações muitos endofíticos podem produzir metabólitos importantes para a relação mutualística (RUDGERS; KOSLOW; CLAY, 2004).

Os metabólitos secundários são moléculas bioativas produzidas pelos microrganismos que, mesmo não sendo necessárias para seu crescimento e desenvolvimento, podem ter propriedades medicinais importantes com ação antibiótica, antitumoral, e de hormônio de crescimento. Por isso, esses metabólitos vêm sendo explorados pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (KELEMU *et al.*, 2001; STROBEL *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2012).

Desde a década de 90 os endofíticos são estudados pelo seu potencial biotecnológico e neste contexto destaca-se o possível uso para controle de doenças em plantas, inibindo o crescimento de fitopatógenos, como relatado por Azevedo em 1997. Esse tipo de controle biológico já era considerado uma alternativa para o uso restrito de fungicidas, posto que fungos existentes no interior de plantas competem por espaço e nutrientes com patógenos, podendo reduzir o desenvolvimento de doenças (AZEVEDO, 1997). Essa relação simbiótica pode trazer tanto vantagens à planta como ao endofítico. Além disso, muitos fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI; STROBEL *et al.*, 2001; ZOU; TAN, 2001).

A presença de endofíticos e dos metabólitos produzidos por eles muitas vezes inibem a herbivoria ou são antagônicos a patógenos, podendo também induzir a produção de hormônios vegetais e aumentar a resistência ao estresse hídrico e a outras adversidades ambientais (FIRÁKOVA; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007, AZEVEDO; ESPOSITO, 2010). O fungo, por sua vez, é favorecido porque, nessa interação, a planta garante a sua sobrevivência disponibilizando nutrientes e proteção (AZEVEDO, 1997, NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Ezra e Strobel (2003) relataram que o fungo *Muscodora albus* inibe e mata diferentes espécies de fungos e bactérias por emissão de compostos orgânicos voláteis.

3.6 Fungos produtores de compostos orgânicos voláteis

Alguns microrganismos, principalmente fungos, são produtores de compostos orgânicos voláteis (COVs) (ROBINSON; PARK, 1966). A partir da década de 60 a procura por novos fungos produtores de COVs e a composição dessas substâncias tem sido foco de pesquisas. Os COVs são resultado de processos metabólicos de plantas, bactérias ou fungos, tais como fermentações anaeróbicas e degradação de substâncias orgânicas complexas (INSAM; SEEWALD, 2010). Fungos pertencentes a gêneros bastante conhecidos como *Fusarium*, (ROBINSON; PARK, 1966) e outros descritos há poucos anos, como fungos do gênero *Muscodora* (STROBEL *et al.*, 2001; WORAPONG *et al.*, 2002), são produtores desses compostos voláteis.

Alguns autores, nos anos 60, começaram a investigar processos e agentes que causavam a inibição da germinação de esporos em fungos. Nessa época, o termo *esporostasis* (esporostático) passou a ser usado para fungos que deixaram de produzir esporos por conta de algum inibidor da própria colônia ou vindo de outras colônias em um curto espaço de tempo (ROBINSON; PARK 1966).

Inicialmente, pensava-se que essa situação fosse causada por alguma enzima remanescente da “cultura paterna”, pois quando uma porção do isolado, sem esporos, era posto em uma nova cultura, o estado esporostático era inibido formando novamente esporos. No entanto, Robinson e Park (1966) testaram uma segunda hipótese utilizando compostos voláteis de isolados de *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus stolonifer* constatando que a não germinação de esporos era causada pela ação de substâncias orgânicas voláteis, produzidas continuamente no micélio do

fungo. Os autores também relataram que concentrações mais baixas desses voláteis, e talvez outros compostos importantes ou complementares, diminuam a atividade inibitória.

Em 1969, Robinson e Garrett identificaram os oito compostos voláteis que inibiam a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum*: acetaldeído, propionaldeído, *n*-butiraldeído, *n*-Propanol, iso-butanol, acetato de etila, acetato de iso-butil e acetona. Destes, o *n*-propanol e acetaldeído estiveram presentes em maior quantidade. O acetato de etila teve o melhor desempenho de inibição impedindo a germinação até 12 horas após o tratamento com o volátil. Os oito compostos juntos provocaram uma inibição maior quando comparado a alguns compostos isoladamente (ROBINSON; GARRETT, 1969).

Como já destacado anteriormente, o desenvolvimento da agricultura, a partir da década de 80, veio acompanhado do aumento do uso de agroquímicos para a contenção de pragas e doenças. Em função disso a demanda por produtos alimentícios livres de resíduos dos agroquímicos, assim como a preocupação com o ambiente, incentivaram estudos voltados ao controle biológico.

A partir de 2001, fungos produtores de compostos orgânicos voláteis do gênero *Muscodor* são descritos como tendo grande potencial biotecnológico (WORAPONG *et al.*, 2001), por terem ações inibitórias ou até letais sobre diversos patógenos (SUWANNARACH *et al.*, 2010, STROBEL, 2011). A utilização destes fungos, produzindo os compostos voláteis, no armazenamento e transporte de frutos, como uvas (GLABER *et al.*, 2010) e pêssegos (SCHANABEL; MARCIER, 2006), impedindo o desenvolvimento de doenças de pós colheita nessas etapas, já é uma realidade.

Alguns autores como Neri, Mari e Brigati, em 2006, utilizando alguns compostos voláteis de plantas conseguiram inibir *in vitro* e *in vivo* o fungo *Penicillium expansum*, causador do bolor azul na pêra e na maçã, demonstrando que o uso de voláteis pode ser uma ótima alternativa para o uso de fungicidas. Outros autores mostraram que, além de poder inibir outros microrganismos, os voláteis poderiam chegar a ser letais para outros fungos e bactérias (ZHANG *et al.*, 2010; SUWANNARACH *et al.*, 2013). Testes de antagonismo entre o fungo produtor de COVs e fitopatógenos, como o fungo *Phyllosticta citricarpa* e *Penicillium digitatum* podem indicar um possível metabólito volátil a ser utilizado em tratamentos pós-colheita de citros, principalmente, nas etapas de armazenamento e transporte.

3.7 Identificação dos compostos orgânicos voláteis.

Para a identificação de metabólitos de interesse produzidos por fungos são utilizadas diversas técnicas (LARSEN; FRISVAD, 1995) como, por exemplo, a ressonância magnética nuclear (SPECIAN *et al.*, 2012) e a micro-extração em fase sólida seguida de cromatografia gasosa (STROBEL *et al.*, 2001, ATMOSUKARTO *et al.*, 2005).

Para a identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos é necessário a captura do ar do recipiente onde a cultura do organismo, produtor do volátil, é feita. No método de micro-extração em fase sólida, ou SPME, é usada uma seringa para a captura do ar do recipiente (LARSEN; FRISVAD, 1995, STROBEL *et al.*, 2001, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Após a captura do ar do recipiente de cultivo do fungo, a identificação dos compostos pode ser feita por cromatografia gasosa, como utilizada por Strobel (2001) na identificação de voláteis antimicrobianos em *Muscodor albus*. O método utilizado por Strobel combinou as características de cromatografia gasosa (CG), para a separação de compostos, e a espectrometria de massa (MS) para a identificação dos diversos compostos orgânicos voláteis. Essa identificação é feita com base no próprio banco de dados online da biblioteca, conhecido como NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Essa metodologia tem sido utilizada para a caracterização de voláteis de diversas espécies de fungos, inclusive espécies distintas de *Muscodor* (DAISY *et al.*, 2002, MITCHELL *et al.*, 2008, GONZÁLEZ *et al.*, 2009, KUDALKAR *et al.*, 2012,).

3.8 Fungo endofítico do gênero *Muscodor*.

O primeiro fungo do gênero *Muscodor* descrito por Worapong, Strobel e Hess, foi *Muscodor albus* em 2001. Esse gênero tem atualmente em torno de 9 espécies descritas: *M. roseus* (WORAPONG *et al.*, 2002), *M. vitigenus* (DAISY *et al.*, 2002), *M. yucatanensis* (GONZÁLEZ *et al.*, 2009), *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012), *M. crispans* (MITCHELL *et al.*, 2008), *M. fengyangensis* (ZHANG *et al.*, 2010), *M. cinnamomi* (SUWANNARACH *et al.*, 2010) *M. kashayum* (MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014), *M. tigerii* (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014).

Os fungos deste gênero são pertencentes à família *Xylareaceae* e apresentam algumas características típicas como micélio esbranquiçado, ausência de produção de esporos e produção de compostos orgânicos voláteis com potencial biotecnológico. No entanto, cada espécie apresenta variações de compostos voláteis que são também utilizados para a caracterização das mesmas (EZRA; HESS; STROBEL, 2004, KUDALKAR *et al.*, 2012,).

O gênero *Muscodor* foi isolado em diferentes localidades. Strobel, em 2011, cita regiões da América Central, Ásia e na América do Sul somente na Bolívia e Peru, não havendo até o momento, registro de isolados deste gênero no Brasil.

A produção de diferentes compostos orgânicos voláteis por fungos do gênero *Muscodor* é vista com entusiasmo pela indústria biotecnológica e pelos produtores agrícolas, especialmente os interessados em culturas orgânicas. Esses compostos voláteis apresentam ações de inibição ou até de letalidade, em alguns casos, contra outros microrganismos, bactérias e fungos patogênicos humanos e fitopatogênicos (SUWANNARACH *et al.*, 2010, STROBEL, 2011). A maior parte dos isolados de *Muscodor* produzem voláteis com ação antifúngica, mas alguns apresentam ainda ação antibacteriana como é o caso de *M. crispans*, (MITCHELL *et al.*, 2008), *M. fengyangensis* (ZHANG *et al.*, 2010) e *M. albus* (WORAPONG, STROBEL; HESS, 2001). Os voláteis de *Muscodor vitigenus*, descritos por Daisy *et al.*, em 2002, mostraram ação inseticida, pela presença de Naftaleno (QUADRO 1).

Característica	<i>M. sutura</i>	<i>M.albus</i>	<i>M.vitigenus</i>	<i>M.cinnamomi</i>	<i>M.crispans</i>	<i>M.fengyangensis</i>
Produção de pigmento	Avermelhado no escuro	Nenhum	Nenhum	Alaranjado pálido na luz	Avermelhado na luz	Pigmento amarelo
Crescimento da hifa na colônia	Padrão de sutura- novo crescimento em BDA	Hifas retas	Hifas retas	Hifas retas	Hifas novas fortemente onduladas	Hifas retas
Esporos	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Crescimento micelial	Emaranhado de hifas	Emaranhado de hifas	Emaranhado de hifas	Emaranhado de hifas	Emaranhado de hifas	Emaranhado de hifas
Compostos voláteis majoritários	Ácido propanoico, 2 metil thujopseno	Ácido propanóico, 2 metil, naftaleno e derivados de azuleno	Naftaleno	Ácido propanóico, 2 metil, metil ester, β-humuleno	Ácido propanóico, 2 metil e muitos ésteres	Azuleno e derivados de Naftaleno entre outros
Bioatividade	Antifúngica	Antifúngica e bactericida	Inseticida	Não estudado	Antifúngica e bactericida	Antifúngica e bactericida

Quadro 1: Características de algumas espécies de *Muscodor*

Fonte: Adaptado de KUDALKAR *et al.*; (2012).

3.9 Identificação de fungos por morfologia e sequenciamento de DNA.

A identificação de fungos filamentosos esteve baseada em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas, como conidiogênese e crescimento da colônia ou ainda por processos bioquímicos detectados em meios de cultura, por exemplo. No entanto, com a grande variabilidade genética e a diversidade morfológica dos fungos em determinados estágios de desenvolvimento, as classificações por esses métodos nem sempre eram precisas, podendo gerar resultados dúbios (ATKINS; CLARK, 2004).

A partir de 1970, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foram gerados muitos dados utilizados para a identificação e filogenia de microrganismos, sendo que alguns grupos foram confirmados e outros redefinidos (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os dados moleculares podem ser empregados em todos os níveis taxonômicos. Em níveis mais abrangentes, conduziram à reclassificação de algumas ordens e famílias e, em níveis taxonômicos mais basais, auxiliaram na identificação de espécies, populações e indivíduos (FUTUYMA, 1992, FUTUYMA, 2009).

Os fungos são o segundo maior grupo de organismos eucariontes e, para a identificação de espécies, foram testadas sequências específicas utilizadas em outros grupos, como o reino animal. No entanto, nos fungos a amplificação das regiões testadas não foi tão eficiente quanto para estes outros organismos. A subunidade 1 da oxidase do citocromo apresentou-se de difícil amplificação e, muitas vezes, incluindo grandes íntrons o que impediu que fosse uma boa região de identificação de espécies, além de ser uma região não muito variável. Regiões nucleares do RNA ribossomal apresentaram uma boa comparação com três genes codificadores de proteínas (subunidade maior da RNA polymerase II, segunda maior subunidade da RNA polymerase II, e proteína de manutenção de minicromossomos). As regiões de genes codificadores de proteínas tiveram uma maior percentagem de identificação correta em comparação com o ribossomo. Porém, a amplificação por PCR e sequenciamento foi baixa em alguns grupos taxonômicos levando à eliminação dessas regiões como candidatas universais na identificação de espécies de fungos. Dentre todas as regiões testadas a região ITS, tem a maior probabilidade de identificação bem sucedida para a mais ampla gama de fungos, com o código mais

definido, mostrando variação inter- e intra- específicas (SCHOCH *et al.*, 2012). Desta forma, esta região foi eleita para representar o “DNA barcode” para fungos.

4 Capítulo 1: Artigo a ser submetido à revista *Fungal Ecology*, qualis B1 em Ciências Biológicas I.

Título: *Muscodor* spp isolados no Brasil: identificação, produção de compostos voláteis e potencial uso em controle biológico do fungo *Phyllosticta citricarpa*.

Pena, LC^{1*}; Jung, LF¹; Serviensi, A.; Galli-Terasawa, LV¹; Glienke, C¹; Kava-Cordeiro, V¹

1) Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná- Curitiba, Brasil

* Autor para correspondência: Tel: +55 041 33611731 E-mail: lorecarol@gmail.com
(L. Pena)

RESUMO:

Com o objetivo inicial de selecionar fungos endofíticos de *Citrus sinensis* com potencial antagonista ao fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, foram obtidos 1141 isolados fúngicos de um pomar no estado do Paraná, não afetado pela Mancha Preta dos Citros, doença causada por este fitopatógeno. Um isolado, identificado como *Muscodor* sp (LGMF1254), apresentou os melhores resultados no teste de antagonismo. Este isolado foi utilizado na bioprospecção de um novo isolado deste gênero (LGMF1255) de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), sendo que estes são os primeiros descritos no Brasil do gênero *Muscodor*. Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram antagonismo contra *P. citricarpa* pela produção de compostos orgânicos voláteis cujos compostos majoritários foram identificados como Thujopseno e Ácido benzenodicarboxílico. Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram identidade absoluta por sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 com *M. sutura* e *M. vitigenus*. Com a sequência do gene *rpb2* foi possível diferenciar os isolados LGMF1254 e LGMF1255 de *M. sutura*. Não há disponibilidade desta sequência do gene *rpb2* para *M. vitigenus*. Na análise dos resultados, estes primeiros isolados no Brasil, receberam a denominação de *Muscodor vitigenus* latu sensu pois *M. vitigenus* é a espécie mais antiga deste clado.

Palavras chave: *Xylareaceae*, *Muscodor*, *Citrus sinensis*, *Schinus terebinthifolius*, *Phyllosticta citricarpa*, controle biológico, compostos orgânicos voláteis, sequenciamento de DNA, fungo endofítico, fungo fitopatogênico.

ABSTRACT

With the initial goal of selecting *Citrus sinensis* endophytic fungi with antagonistic potential against the phytopathogenic *Phyllosticta citricarpa*, was obtained 1141 fungal isolates of 443 leaves, representing 1% of a Paraná orchard unaffected by the Citrus Black Spot, an illness caused by this phytopathogen. An isolate, identified as *Muscodor* sp (LGMF1254), presented the best results in the antagonism test. This isolate was used in the bioprospection of an Aroeira medicinal plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) new isolate of the same genus (LGMF1255), being both of them the very first of the *Muscodor* genus described in Brazil. The LGMF1254 e LGMF1255 isolates presented antagonism against *P. citricarpa*, by means of the production of volatiles organic compounds, whose preponderant compounds were identified as Thujopseno and Benzenedicarboxylic acid. Using sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region, the LGMF1254 and LGMF1255 isolates presented absolute identity with *M. sutura* and *M. vitigenus*. With the *rpb2* gene sequence it was possible to differentiate the LGMF1254 and LGMF1255 isolates from *M. sutura*. The *rpb2* de *M. vitigenus* gene sequence is not available in databases. In the results analysis, these first isolates received, in Brazil, the designation of *Muscodor vitigenus latu sense*, since *M. vitigenus* is the oldest species of this clade.

Keywords: *Xylareaceae*, *Muscodor*, *Citrus sinensis*, *Schinus terebinthifolius*, *Phyllosticta citricarpa*, biological control, volatiles organic compounds, DNA sequencing, endophytic fungi, phytopathogenic fungi.

INTRODUÇÃO.

O primeiro isolado identificado do fungo endofítico do gênero *Muscodor* foi *Muscodor albus*, isolado de uma árvore de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) em Honduras, na América Central (WORAPONG, 2001). Esse gênero de fungo foi encontrado em árvores no México, Bolívia, Peru, China e Índia, além da Austrália (WORAPONG *et al.*, 2001; WORAPONG *et al.*, 2002, DAISY *et al.*, 2002, EZRA *et al.*, 2004, ATMOSUKARTO *et al.*, 2005, STROBEL *et al.*, 2007, MITCHELL *et al.*, 2008, GONZÁLEZ *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2010)

As espécies deste gênero são descritas baseadas na morfologia, no sequenciamento e na verificação da produção de compostos voláteis com ação antimicrobiana em patógenos humanos (ZHANG *et al.*, 2010) e de vegetais (STROBEL *et al.*, 2001, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2013)

Durante a bioprospecção de fungos endofíticos em *Citrus sinensis* e *Schinus terebinthifolius* Raddi, foram detectados dois isolados, os primeiros identificados pertencentes ao gênero *Muscodor* descritos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de fungos endofíticos do gênero *Muscodor*

Com o objetivo de selecionar fungos endofíticos antagonistas ao fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*) de plantas de um pomar de Guairaça, região norte do Paraná sem registro de Mancha Preta dos Citros, doença causada por *P. citricarpa*, foram desinfestadas superficialmente (PETRINI *et al.*, 1991), cortadas (5 mm²), colocadas em BDA e incubadas a 25°C. Os isolados fúngicos obtidos foram agrupados em morfotipos. E um representante de cada morfotipo foi bioprospectado quanto ao potencial de inibição do fitopatógeno *P. citricarpa*. Um isolado com hifas brancas e sem produção de esporos, identificado posteriormente como pertencente ao gênero *Muscodor* (LGMF1254), apresentou os melhores resultados.

Para selecionar outros isolados do gênero *Muscodor* foi utilizado o procedimento relatado por Worapong (2002) e Zhang (2010) uma vez que os fungos do gênero *Muscodor* não são inibidores de fungos do mesmo gênero.

O LGMF1254 foi utilizado como elemento seletivo na placa de Petri para a bioprospecção de novos isolados deste gênero em folhas da árvore medicinal Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)), localizada no Centro Politécnico da UFPR em Curitiba-Paraná.

Folhas da Aroeira foram submetidas ao processo de desinfestação superficial e, posteriormente, fragmentadas (5 mm²) e inoculadas em placas com BDA onde previamente havia sido inoculado o isolado LGMF1254, cinco dias antes. As placas foram incubadas a 28°C e de um fragmento foliar foi obtido um isolado com morfologia semelhante ao isolado LGMF1254, que foi identificado como *Muscodor* sp, e incluindo na coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR com a designação de LGMF1255.

Além destes fungos isolados, LGMF1254 e LGMF1255, foi utilizado o fungo *M. sutura*, para fins de comparação morfológica e de sequenciamento do gene *rpb2*, que foi gentilmente cedido pelo Professor Doutor Gary Strobel, da Universidade de Montana, dos EUA.

O fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* utilizado é proveniente da coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR (LabGeM), identificado como isolado LGMF06.

Identificação dos isolados por sequenciamento da região ITS e RPB2

Foi realizado o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer) do rDNA dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 e parcial do gene *rpb2* (DNA-directed RNA polymerase II subunit) dos isolados *M. sutura*, LGMF1254 e LGMF1255, a fim de identificar os mesmos em nível de espécie. O DNA genômico foi extraído com auxílio do Kit Comercial Ultraclean Microbial (MoBio), seguindo orientações do fabricante.

Os iniciadores utilizados para a amplificação de ITS1-5.8S-ITS2 dos dois isolados foram ITS-1 e ITS-4 (WHITE; MARROW, 1990). A amplificação foi realizada em reação de PCR com um volume final de 12,5 µL solução, em água Mili-Q contendo 1,25 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de

dNTP, 0,2 µM de cada primer, 10 ng de DNA extraído e 1,25 U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). A amplificação para a região IT1-5,8S-ITS2 do rDNA foi realizada com desnaturação inicial a 96° C por 2 minutos; 35 ciclos de 60 segundos a 96° C, 60 segundos a 55° C, 2 minutos a 72° C; seguida de extensão final de 10 minutos a 72° C.

Para a amplificação e posterior sequenciamento parcial do gene *rpb2* os iniciadores utilizados foram *RPB25F* e *RPB27cR* (LIU, WHERLEN, HALL, 1999). A PCR seguiu os mesmos parâmetros da amplificação da região ITS. A amplificação parcial do gene *rpb2* foi realizada com desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 95° C, 2 minutos a 55° C, 2 minutos a 72° C; seguida de extensão final de 10 minutos a 72° C.

Para a purificação dos PCRs foram utilizadas as enzimas Exo 1 e Fast AP. Para cada solução foram colocados 0,34 µL de água Mili-Q e 0,33 µL de cada enzima. Para a finalização da purificação as soluções foram colocadas no termociclador em um ciclo de 37°C por 1 hora e 85°C por 15 minutos.

Para a reação de sequenciamento foram utilizados 3 µL de DNA purificado, 0,5 µL de primer, 2 µL de tampão de Big Dye e 1 µL de Big Dye e água ultrapura quando necessária para completar o volume final de 10 µL. A amplificação de ambos os fragmentos foram realizadas seguindo desnaturação inicial a 96° C por 1 minuto; 25 ciclos de 15 segundos a 96° C, 15 segundos a 50° C e 4 minutos a 60°C.

As reações de sequenciamento foram purificadas com Sephadex™ G-50 *Fine DNA Grade* e o sequenciamento dos fragmentos foi realizado no sequenciador ABI 3500 usando os iniciadores correspondentes.

A edição e o alinhamento das sequências obtidas foram realizados com auxílio dos programas BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 2001) e MEGA 5.1 (TAMURA *et al.*, 2008).

Essas sequências foram confrontadas com as sequências do banco de dados do *GenBank* usando o programa BLAST. As sequências com grande similaridade e cobertura, juntamente com as sequências de referência de várias espécies deste gênero disponíveis no *GenBank*, foram utilizadas para montar a árvore filogenética. Para a análise filogenética o modelo evolutivo foi testado no software MEGA e a árvore Bayesiana, com 10.000 gerações, foi realizada com o software Mr.Bayes v.3.1.1 (RONQUIST; HUELSENBECK; TESLENKO, 2003). Como grupo externo foi utilizada uma sequência de Xylareaceae (AM921731) já usada por Zhang *et al*, 2010.

Avaliação da atividade de antagonismo dos isolados de *Muscodor* contra o fungo *Phyllosticta citricarpa*

Antagonismo dos isolados de *Muscodor* contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

Para testar o antagonismo contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, no tratamentos, discos de micélio (Ø 5 mm) do isolado LGMF1254 e do patógeno foram colocados em lados opostos de placa de Petri, em metodologia adaptada de Mariano (1993), vedadas com fita adesiva. Como controle, apenas discos de micélio do fitopatógeno foram depositados sobre a placa, dispostos da mesma forma que nos tratamentos (RODRIGUEZ *et al.*, 2007). A primeira avaliação do experimento foi realizada 10 dias após inoculação. Foram realizadas três réplicas deste experimento.

Avaliação da atividade antifúngica dos compostos voláteis produzidos pelo isolado de *Muscodor*, LGMF1254

A avaliação da atividade dos compostos voláteis com possível ação dos isolados de *Muscodor* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Strobel *et al.*, 2001, usando o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. A avaliação deste experimento foi realizada pela comparação de crescimento micelial entre tratamentos e controles após 7, 14, 30 e 42 dias de crescimento, utilizando a análise de imagem com o programa para processamento de imagens científicas Image J 1.45. Foram realizadas três réplicas deste experimento.

Avaliação da ação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo LGMF1254 sobre a produção de picnídios do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

Para testar a inibição da produção de picnídios por *Phyllosticta citricarpa*, devido à produção de metabólitos voláteis pelo fungo LGMF1254, foi realizado confronto em placas de Petri com divisória, adaptado de Baldassari, Reis e Goes (2009). Discos de 10mm de diâmetro de folhas de citros previamente autoclavados foram circundados por quatro inóculos do fitopatógeno. Nos controles positivos de crescimento para produção de picnídios, o fungo LGMF1254 estava ausente, enquanto nos tratamentos, um inóculo (5mm de diâmetro) deste isolado foi depositado no lado oposto da placa com divisória. Foram feitas três repetições independentes do experimento, com seis

placas controle e seis placas tratamento em cada repetição. A cada cinco dias uma placa controle e uma tratamento tiveram os inóculos de *Phyllosticta citricarpa* transferidos para uma placa com meio BDA pH 5,8 para avaliação da possível ação fungicida ou fungistática dos compostos orgânicos voláteis sobre os inóculos de *P. citricarpa*.

Avaliação comparativa do crescimento micelial do isolado LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* em diferentes temperaturas

Discos de micélio (5 mm de diâmetro) dos isolados de *Muscodor* crescidos por 10 dias foram retirados e inoculados no centro de uma placa de Petri com meio Ágar dextrose batata comercial (BDA MERCK). As placas foram mantidas a temperaturas de 23°C, 28°C e 37°C durante 10 dias. As avaliações ocorreram diariamente medindo-se os eixos X e Y dos inóculos. Posteriormente, com as medições, foram realizados os cálculos de área da colônia. O experimento foi realizado em quintuplicata, comprovando a normalidade dos dados; a análise de variância foi realizada e foi aplicado o teste de Tukey com auxílio do programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Avaliação de crescimento micelial dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* em diferentes meios de cultura

Para avaliar a diferença de crescimento e morfologia em meios de cultura diferentes, os isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* tiveram um disco de micélio de 5 mm repicado no centro de placas de cinco meios de cultura diferentes: Meio mínimo, citros, BDA comercial, Sabouraud e MEA (composição dos meios no apêndice III). As placas foram vedadas com fita adesiva e armazenadas em B.O.D com temperatura de aproximadamente 25°C. A avaliação de crescimento foi realizada pelas medidas dos eixos X e Y, todos os dias por um período de 10 dias. O experimento foi realizado em triplicata. Comprovando-se a normalidade dos dados, a análise de variância foi realizada e, quando necessário, foi aplicado o teste de Tukey com auxílio do programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O processamento das amostras foi iniciado com fixação das amostras por solução de Karnoviski (0,1 M, pH 7,2) por 23 horas em temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras passaram por desidratação gradual com álcool: 10 minutos em álcool 10%, 30%, 50%; três repetições em cada concentração e posteriormente três repetições de 15 minutos em álcool 70%, 95% e 100% (MERCK).

Após a desidratação o material ficou em álcool 100% durante aproximadamente 72 horas. As amostras foram lavadas com tampão Cacodilato (0,4 M) e posteriormente foi realizado o ponto crítico (BAL-TEC CPD 030) e cobertura de 80 nanômetros de ouro em cada amostra (BAL-TEC SCD 050). As imagens foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura VEGA 3 TESCAN em alto vácuo. A microscopia permitiu realizar medições dos diâmetros das hifas nos dois isolados.

Caracterização dos compostos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255

Para a caracterização dos compostos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255, os fungos foram cultivados em tubos de penicilina com tampa emborrachada contendo meio de cultura BDA comercial (MERCK). Destes frascos foram captados compostos voláteis por meio de Micro-extração em fase sólida (SPME) pela exposição da fibra da seringa (fiber assembly Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), por uma hora.

Os gases captados foram avaliados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu® GCMS –QP 2010 Plus, equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250°C, interface e fonte de íons a 300°C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 450, utilizando Hélio (He) como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250°C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 30°C por 5 minutos elevando-se para 250 °C a uma razão de 5° C/min. Os resultados foram comparados com a biblioteca de dados do equipamento (NIST- *National Institute of Standards and Technology*).

RESULTADOS

Isolamento dos fungos endofíticos

De 443 folhas coletadas das plantas de *Citrus sinensis* do pomar de Guairaça – PR resultaram 1141 isolados fúngicos que foram agrupados em 67 morfotipos. De cada morfotipo foi selecionado um isolado para testes de antagonismo com o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. Quando bioprospectados, vários destes isolados apresentaram resultados promissores, inibindo o crescimento micelial do fitopatógeno, sendo que um dos isolados apresentou inibição superior a 65% (JUNG, 2011). Esse isolado foi adicionado à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR e denominado LGMF1254. Posteriormente o isolado LGMF1254 foi identificado como pertencente ao gênero *Muscodor*. Do isolamento de fungos endofíticos provenientes de folhas de Aroeira foi possível selecionar um fungo bastante semelhante ao isolado do laboratório LGMF1254, utilizado como fungo “seletivo” na mesma placa de Petri posto que os fungos do gênero *Muscodor* não são capazes de inibir o crescimento de fungos do mesmo gênero.

O isolado LGMF1255 foi inoculado em cultura pareada com o isolado LGMF1254, a fim de avaliar se o fungo *Muscodor* pertencente à coleção do laboratório era capaz de inibir o crescimento deste isolado e como resultado não foi observado inibição do mesmo (Figura 2).

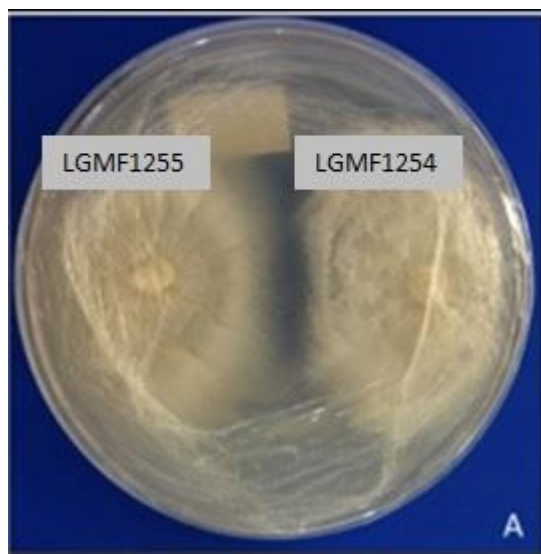


FIGURA 2: Macromorfologia dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 em cultura pareada.

Identificação por PCR e sequenciamento

O isolado LGMF1254, bem como o isolado LGMF1255, tiveram a região ITS amplificada sendo que, foram analisados 486 pares de base. O modelo evolutivo empregado para tal análise foi o Kimura 2 parâmetros com distribuição Gama.

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA permitiu a confirmação da identificação dos isolados como pertencentes ao gênero *Muscodor*. Na árvore filogenética Bayesiana houve a separação das sequências em três clados (Figura 3). O clado 1 é composto por várias espécies deste gênero como *M. albus*, *M. roseus*, *M. cinammomi* e *M. crispans*. No clado 3 estão presentes apenas isolados de *M. fengyangensis*. As sequências dos isolados LGMF1255, LGMF1254, *M. sutura* e *M. vitigenus*, estes últimos com sequências já depositadas do banco de dados GenBank aparecem no mesmo clado (clado 2), e com bom suporte de *bootstrap*, que impossibilitou a separação em espécies dos isolados com essas duas espécies, *M. sutura* e *M. vitigenus* (Figura 3).

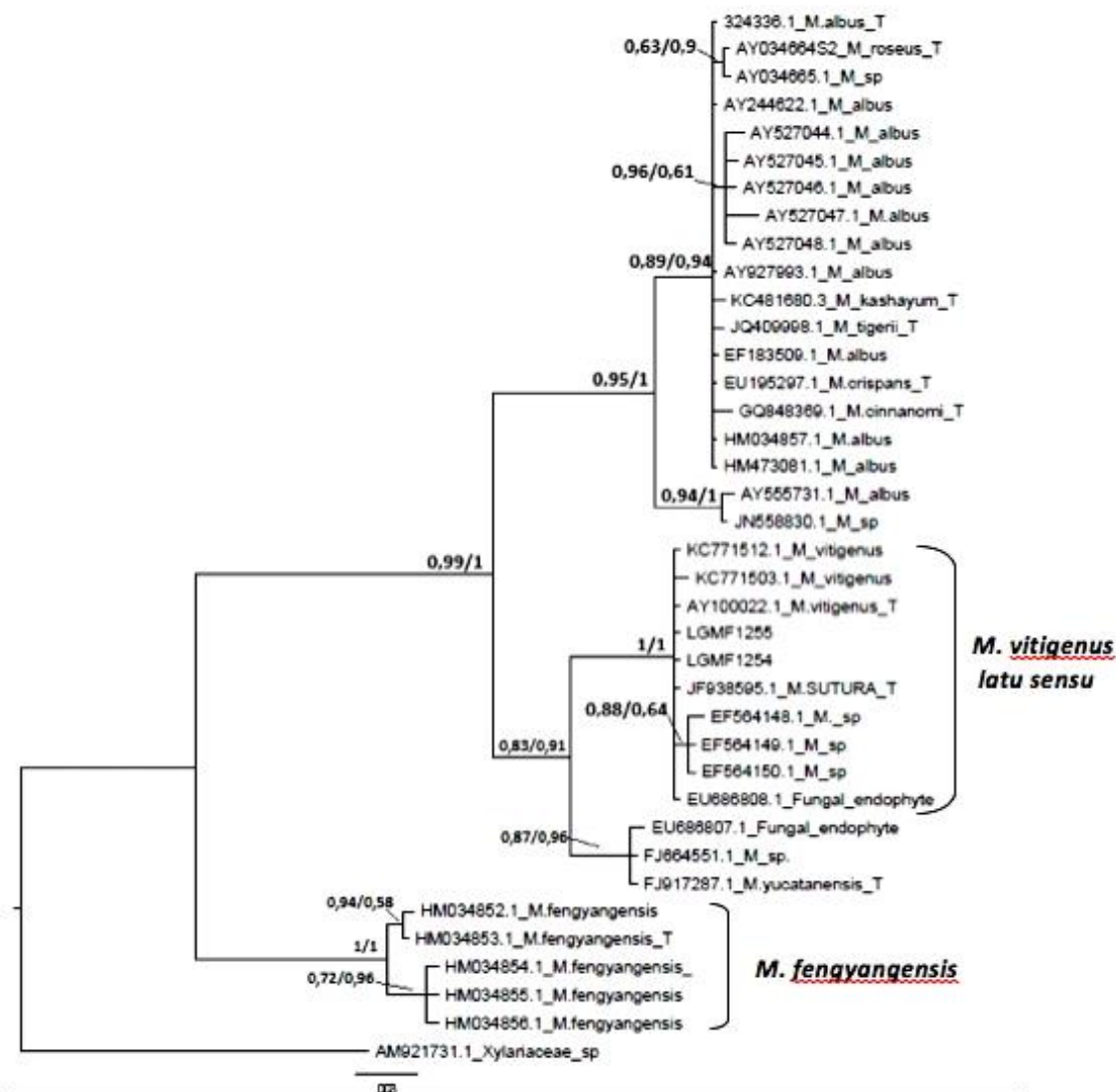


FIGURA 3: Árvore filogenética do alinhamento de seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Nota: Os valores de suporte estão apresentados a direita do nó, sendo os valores de *bootstrap* de Máxima Verossimilhança probabilidade a *posteriori* da Inferência Bayesiana apresentados nesta ordem.

Ao analisar as seqüências da região da subunidade maior da RNA polimerase II (*RPB2*), para tentar definir as espécies, foi possível observar que há algumas diferenças significativas dos isolados LGMF1254 e LGMF1255, principalmente mutações de ponto, com o *M. sutura* que também teve o sequenciamento desta região realizado nesse trabalho. Estas mutações são, na sua maioria, transições e é possível também observar uma transversão, que é uma mutação mais rara (Figura 4). Essa mutação ocasiona um distanciamento significativo dessas seqüências em análise filogenética. Com essas variações na seqüência do gene *rpb2* constatou-se que os isolados *M. sutura* e LGMF1254 não são da mesma espécie, mesmo que as seqüências de ITS sejam iguais. Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 além de

apresentarem sequências de ITS iguais também apresentaram igualdade absoluta na sequência do gene *rpb2*. Foi feita também uma árvore filogenética no software GARLI com sequências do gene *rpb2* a fim de comparar as sequências depositadas no GenBank para o gênero *Muscodor* (Figura 5 e Quadro 2). Observa-se na árvore que os isolados de *M. fengyangensis* apresentam variações intraespecíficas e estão separados em um clado distinto do *M. albus* e distinto dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura*. Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 estão próximos ao *M. sutura*, com valores de *bootstrap* bastante altos.

322	331	412	448	475	688	706	757	796	928	Isolados
TCGGC	CGACA	CCACC	TACAT	GAGAC	CTGAC	GAGGG	ATTTG	TGACA	GTGAA	LGMF1254
TCGGC	CGACA	CCACC	TACAT	GAGAC	CTGAC	GAGGG	ATTTG	TGACA		LGMF1255
TCGGT	CGACT	CCACT	TACAC	GAGAT	CTGAT	GAGGA	ATTTA	TGACG	GTGAG	M. sutura
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

FIGURA 4: Região de variação de parte da sequência do gene *rpb2* dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M.sutura*.
 Nota: As bases caracterizadas em cinza claro representam as bases mutadas na sequência do gene *rpb2*

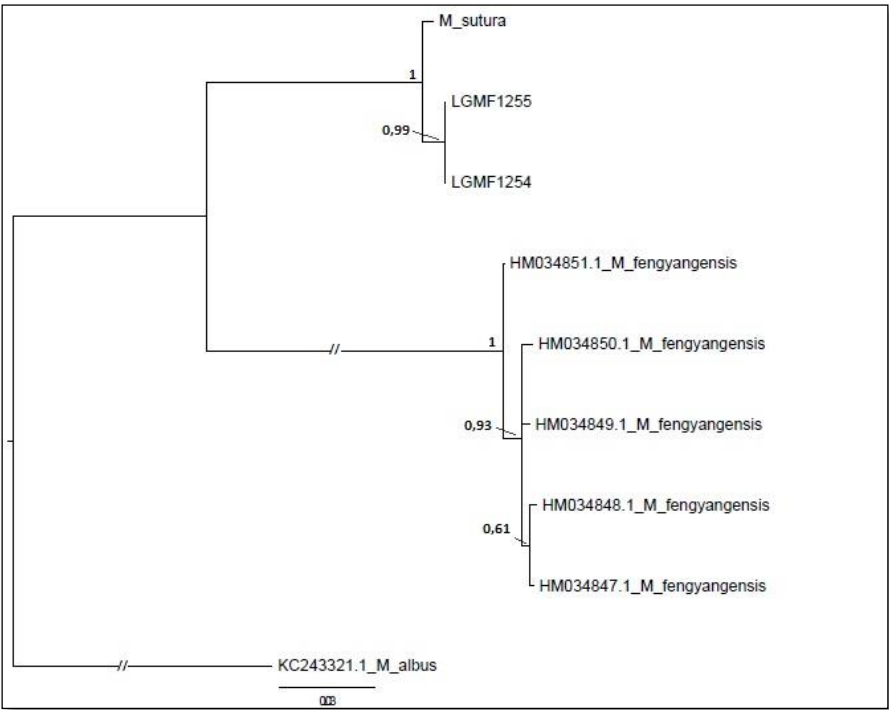


FIGURA 5: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do alinhamento de sequências do gene *rpb2* dos isolados de *Muscodor*.
 Nota: Os valores de *bootstrap* estão apresentados a esquerda dos nós, valores com 1000 reamostragens.

Table 1: Host, location, GenBank data and Volatile compounds from endophytic fungi of the genus <i>Muscodora</i>							
especies	Cultura	Hospedeiro	País	nº GenBank		Voláteis majoritários	Referências
				ITS	RPB2		
<i>M. albus</i>	CZ620	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Honduras	AF324336	—	Propanoic acid 2methyl, methyl ester, 1butanol, 3 methyl, Ethyl acetate, Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester	Worapong et al., 2001
<i>M. albus</i>	I-413s	—	Indonésia	AY927993	—	Aromadendrene, 1H-cycloprop[5] azulene, acetato 3 metil 1-butanol, fenil etil álcool, Propanoic acid 2methyl, phenylethyl alcohol	Atmoskarto et al., 2005
<i>M. albus</i>	<i>albus</i> 9-6	—	—	HM034857	—	Propanoic acid 2methyl, 1butanol, 3 methyl, Caryophyllene, naphthalene	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>M. albus</i>	—	<i>Myristica fragrans</i>	Taiândia	AY244622	—	—	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>M. albus</i>	GP 115	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Australia	AY527047	—	naphthalene, Azulene, 1butanol, 3 methyl	Ezra et al., 2004
<i>M. albus</i>	GP 206	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Australia	AY527048	—	naphthalene, Azulene, 1butanol, 3 methyl, Propanoic acid 2methyl	
<i>M. albus</i>	KN 27	<i>kennidia nigriscans</i>	Australia	AY527046	—	naphthalene, Azulene	
<i>M. albus</i>	KN26	<i>kennidia nigriscans</i>	Australia	AY527044	—	naphthalene, Propanoic acid 2methyl, 1butanol, 3 methyl	
<i>M. albus</i>	TP 21	<i>Terminalia prostrata</i>	Australia	AY527045	—	naphthalene	
<i>M. albus</i>	E-6	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Equador	EF183509	—	Propanoic acid 2methyl, Propanoic acid 2methyl, methyl ester, 1butanol, 3 methyl	Strobel et al., 2007
<i>M. albus</i>	CMU44	—	—	HM473081	—	—	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>M. albus</i>	GP100	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Australia	AY555731	—	naphthalene, Propanoic acid 2methyl	Ezra et al., 2004
<i>Muscodora</i> sp	CMU462	—	—	JN558830	—	—	Suwanarach et al., 2010
<i>Muscodora</i> sp	M7	<i>Garcinia</i> sp.	Taiândia	EF564149	—	—	Strobel et al., 2007
<i>Muscodora</i> sp	N28	<i>Garcinia</i> sp.	Taiândia	EU564150	—	—	Phongpaichit et al., 2007
<i>Muscodora</i> sp	D31	<i>Garcinia</i> sp.	Taiândia	EF564148	—	—	
<i>Muscodora</i> sp	WG-2009a	—	Malásia	FJ664551	—	—	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>Fungal endophyte</i>	1138	<i>streptochaeta spicata</i>	—	EU686808	—	Acetato 3 metilbutil, etanol	
<i>Fungal endophyte</i>	1128	<i>Chusquea simpliciflora</i>	—	EU686807	—	—	
<i>M. crispans</i>	B-23	<i>Ananas ananassoides</i>	Bolívia	EU195297	—	—	Mitchell et al., 2008
<i>M. fengyangensis</i>	ZJLQ023	<i>Actinidia chinensis</i>	China	HM034856	HM34849	Propanoic acid 2methyl, beta-phellandrene, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester	Zhang et al., 2010
<i>M. fengyangensis</i>	ZJLQ024	<i>Actinidia chinensis</i>	China	HM034855	HM34851	beta-phellandrene, Propanoic acid 2methyl, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester	
<i>M. fengyangensis</i>	ZJLQ374	<i>Pseudotaxus chienii</i>	China	HM034854	HM38850	Propanoic acid 2methyl, beta-phellandrene, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester	
<i>M. fengyangensis</i>	ZJLQ070	unknown broad leaf tree	China	HM034853	HM034847	Propanoic acid 2methyl, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester, beta-phellandrene	
<i>M. fengyangensis</i>	ZJLQ151	<i>Pseudotaxus chienii</i>	China	HM034852	HM034848	Propanoic acid 2methyl, beta-phellandrene, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester	
<i>M. vitigenus</i>	—	<i>Paulinia paulinoides</i>	Peru	AY100022	—	naphthalene, 2 methyl naphthalene	Daisy, et al., 2002
<i>M. vitigenus</i>	CEQCA-01100	—	—	KC771512	—	—	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>M. vitigenus</i>	CEQCA-00372	—	—	KC771503	—	—	Dados não publicados - Sequencia no NCBI
<i>M. sutura</i>	CA-22D	<i>Prestonia trifida</i>	Colômbia	JF938595	—	Propanoic acid 2, butanoic acid, 2 methyl, propanoic acid, 2 methyl, methyl ester, Thujopsene	Kudalkar, et al., 2012
<i>M. cinnamomi</i>	CMU-Cib451	<i>Cinnamomum bejolghota</i>	Taiândia	GQ848369	—	—	Suwanarach, et al.,
<i>M. yucatanensis</i>	MEXU	<i>Bursera simaruba</i>	México	FJ917287	—	Caryophyllene, Aromadendrene	González et al., 2010
<i>M. tigerii</i>	#2 CCSTTD	<i>Cinnamomum camphora</i>	Índia	JQ409998	—	octadecylmorpholine, Tetradecanamide, N,N-dimethyl, 12-Benzenedicarboxylic acid, Asarone	Saxena, et al., 2014
<i>M. kashayum</i>	#16 AMLWLS	<i>Aegle marmelos</i>	Índia	KC481680	—	beta-Bisabolol, 2,6-bis(1-(1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol, 3-cyclohexen-1-ol, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl	Meshram et al., 2013
<i>M. darjeelingensis</i>	1CCSTTD	<i>Cinnamomum camphora</i>	Índia	JQ409997	—	—	Meshram et al., 2014
<i>M. strobilii</i>	#6610	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Índia	JQ409999	—	—	Saxenas et al., 2014b
<i>M. vitigenus</i> latu senso	LGM F1254	<i>Citrus cinensis</i>	Brasil			Thunjopsene, 12-Benzenedicarboxylic acid, Beta-chamigrene, Benzyl benzoate	The present paper
	LGM F1255	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Brasil			Thunjopsene, 12-Benzenedicarboxylic acid	
Xylariaceae sp.	IZ-1249	—	—	AM921731	—	—	—

Quadro 2: Hospedeiro, Localização, dados do *GenBank* e compostos voláteis produzidos por fungos do gênero *Muscodora*

Metodologias de avaliação de antagonismo dos isolados de *Muscodor* contra o fungo *P. citricarpa*

Antagonismo dos isolados de *Muscodor* contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 inibiram 100% o crescimento da linhagem LGMF06 do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* (Figura 6).

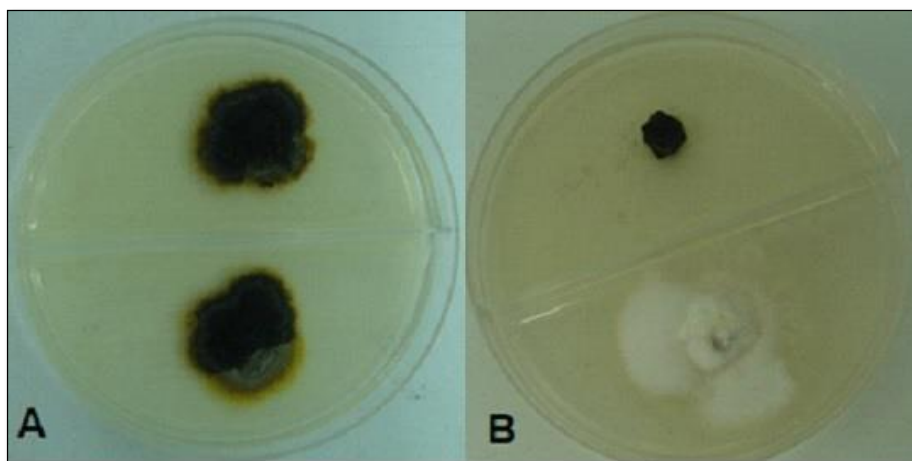


FIGURA 6: Inibição do fungo *Phyllosticta citricarpa* pelos voláteis do isolado LGMF1254
Nota: A) Controle positivo de *P. citricarpa*. B) Tratamento de *P. citricarpa* pelo isolado LGMF1254

Avaliação da atividade antifúngica dos compostos voláteis produzidos pelo isolado de *Muscodor*.

Quando testada a ação antifúngica do isolado LGMF1254, contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, foi possível verificar que, nos tratamentos, não houve crescimento micelial do fitopatógeno durante todo o período de avaliação do experimento. Ao contrário, o fitopatógeno no controle, durante o mesmo período de tempo, apresentou crescimento dentro do esperado (Gráfico 1 e Figura 7).

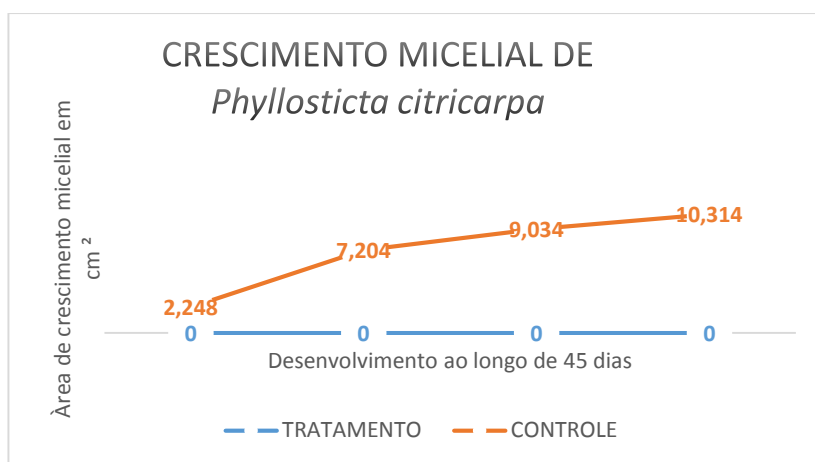


Gráfico 1: Área das colônias em centímetros quadrados ao longo de 45 dias de crescimento micelial
 Nota: Avaliação em 7, 15, 30 e 45 dias de crescimento em meio BDA, controles comparado com os tratamentos cultivados com o LGMF1254. Avaliação com o Programa Image J.

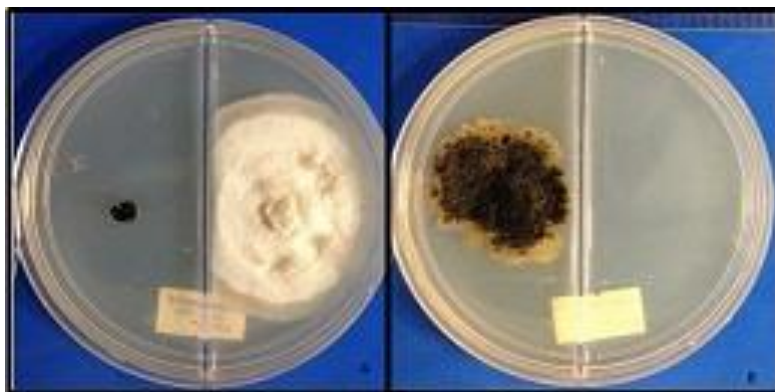


FIGURA 7: Crescimento micelial do fungo *Phyllosticta citricarpa* após 45 dias a 25°C
 Notas: A) Tratamento: placa com o fitopatógeno à esquerda e o com o isolado LGMF1254 à direita. B) Controle: placa com o fitopatógeno à esquerda.

Avaliação da ação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo LGMF1254 na produção de picnídios do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*.

Em testes com metabólitos voláteis foi verificado que o isolado LGMF1254 inibiu o crescimento micelial dos inóculos de *Phyllosticta citricarpa* e também impediu a produção de picnídios pelo fitopatógeno (Figura 8).

O volátil apresentou potencial ação fungicida após o 10º dia de tratamento. Na etapa de avaliação da ação do fungicida 4% dos inóculos, nos controles, não apresentaram crescimento viável e aproximadamente 95% dos inóculos de *Phyllosticta citricarpa*, nos tratamentos, foram inibidos durante todos os momentos de avaliação até o final do experimento.

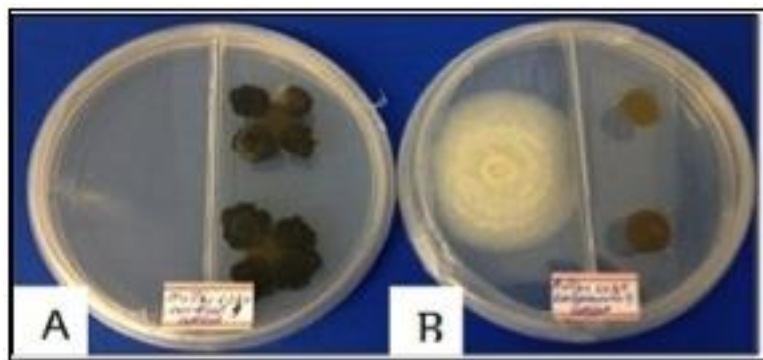


FIGURA 8: Ação dos compostos voláteis produzido pelo fungo *Muscodor* (LGMF1254) contra o fungo *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06) após 15 dias.

Nota: A) Controle: placa com o fitopatógeno à direita e B) Tratamento: placa com o fitopatógeno à direita e o com o isolado LGMF1254 à esquerda.

Avaliação comparativa do crescimento micelial do isolado LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* em diferentes temperaturas

Os isolados de *Muscodor* apresentaram particularidades de crescimento nas diferentes temperaturas. A 23°C o isolado LGMF1254 foi o que apresentou o melhor crescimento radial enquanto o isolado LGMF1255 e o *M. sutura*, não apresentaram diferenças significativas. A 28°C o isolado *M. sutura* foi o que apresentou o melhor crescimento radial, enquanto os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram colônias menores, significativamente diferentes (Gráfico 2). A 37°C não houve o crescimento de nenhum isolado.

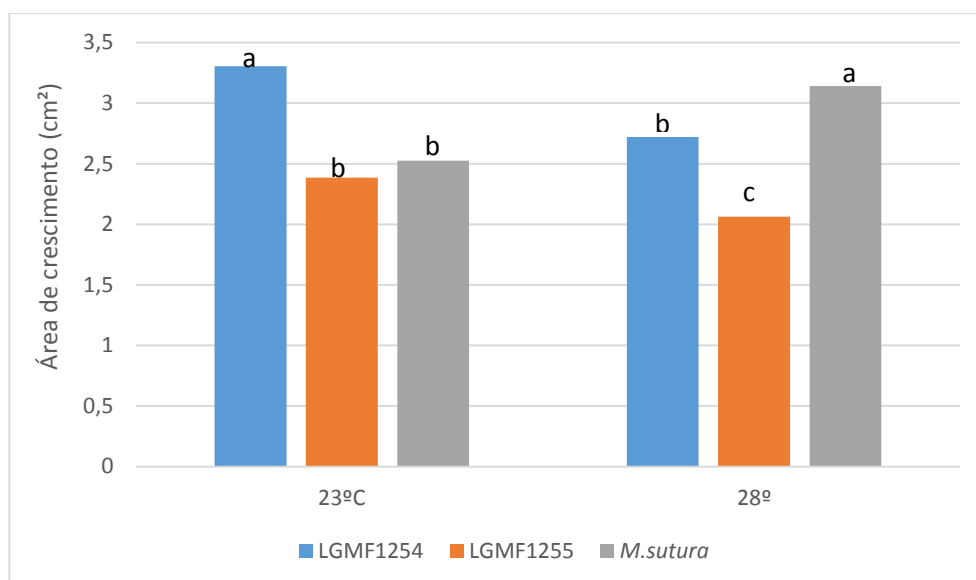


Gráfico 2: Área de crescimento das colônias dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* a 23 e 28°C após 10 dias de incubação

Nota: Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes a nível de 5% de significância.

Crescimento micelial dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* em diferentes meios de cultura

Diferença de crescimento micelial entre os isolados ensaiados em diferentes meios de cultura permitiu definir algumas diferenças morfológicas para a caracterização destes isolados fúngicos (Figuras 9, 10 e 11).

No comparativo entre os isolados em um mesmo meio constatou-se que no meio mínimo houve pouco crescimento dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 e crescimento significativamente maior após 10 dias de cultura, com o dobro da área da colônia de *M. sutura*, em comparação aos outros isolados (dados em apêndice). Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram micélio com hifas dispersas enquanto o *M. sutura* apresentou micélio denso com hifas compactas e maior diâmetro da colônia. No meio Sabouraud, observou-se um crescimento sem variações significativas entre os fungos e todos os fungos apresentaram micélio denso com hifas compactas sendo que o isolado LGMF1255 apresentou divisões em raios ao longo do micélio (Figuras 9B, 10B e 11B). No meio Citros os fungos não apresentaram diferenças significativas no crescimento e tampouco diferenças nos micélios. No meio MEA, a taxa de crescimento destes fungos foi igual e diferenças sutis na densidade do micélio dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 foram identificadas, sendo que o *M. sutura* apresentou um micélio mais denso neste meio.

No meio BDA a taxa de crescimento dos isolados também não mostrou diferenças significativas apresentando, no entanto, diferenças na macromorfologia dos micélios. O isolado LGMF1254 apresentou micélio mais escuro nas bordas e mais claro no centro; o isolado LGMF1255 um micélio mais compacto, impedindo a definição visual das hifas enquanto o isolado *M. sutura* apresentou micélio denso com hifas visíveis e definidas apenas próximo às bordas (Figuras 9, 10 e 11).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Avaliando os isolados LGMF1254 e LGMF1255 em MEV foi possível observar agrupamento de hifas em feixes, característicos desse gênero. Em algumas amostras foram observados feixes de hifas cortados e a partir deles foi possível medir o diâmetro médio de, no mínimo oito hifas dos isolados LGMF1254 (1,45 μm) e LGMF1255 (1,34 μm), além de ter uma visão geral do modo de crescimento dos fungos. Algumas hifas apresentaram protuberâncias como vesículas (Figuras 12C e 13B); ocorreram também estruturas modificadas em forma de couve-flor (*cauliflower-like*) entre as hifas, (Figuras 12F e 13E e 13F) semelhantes as descritas na literatura para esse gênero (MITCHELL *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2010). Em amostra do isolado LGMF1255 foi possível observar também o micélio crescendo submerso no meio de cultura (Figuras 13 C e D).

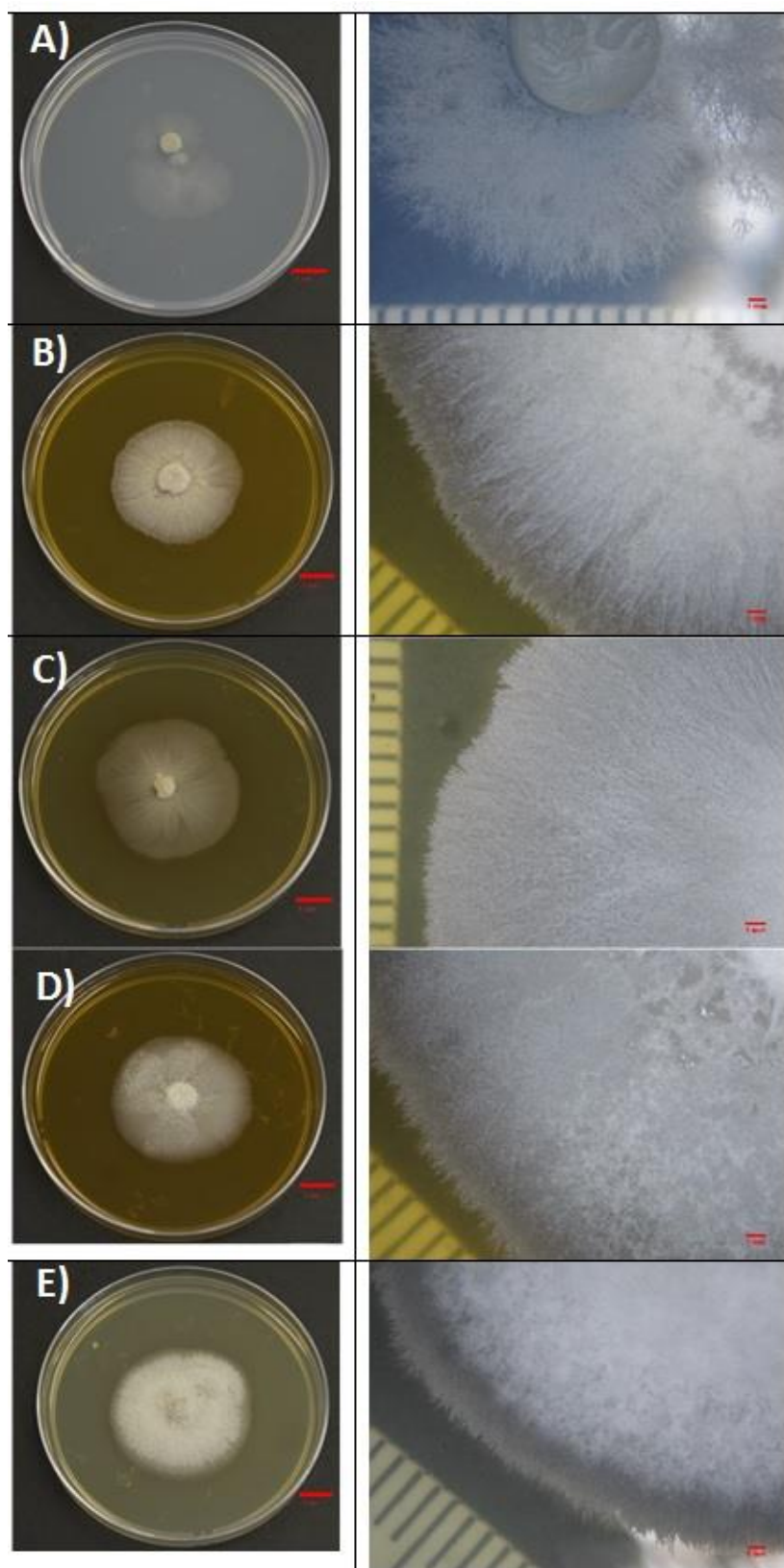


FIGURA 9: Macromorfologia do isolado LGMF1254 em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.

Notas: Aspecto geral da colônia na coluna da esquerda (Barra de marcação = 1cm) e detalhes de crescimento da borda da colônia na coluna da direita (Barra de marcação = 1mm) nos seguintes meios

A) Meio Mínimo. B) meio Sabouraud C) meio Citros D) meio MEA e E) BDA

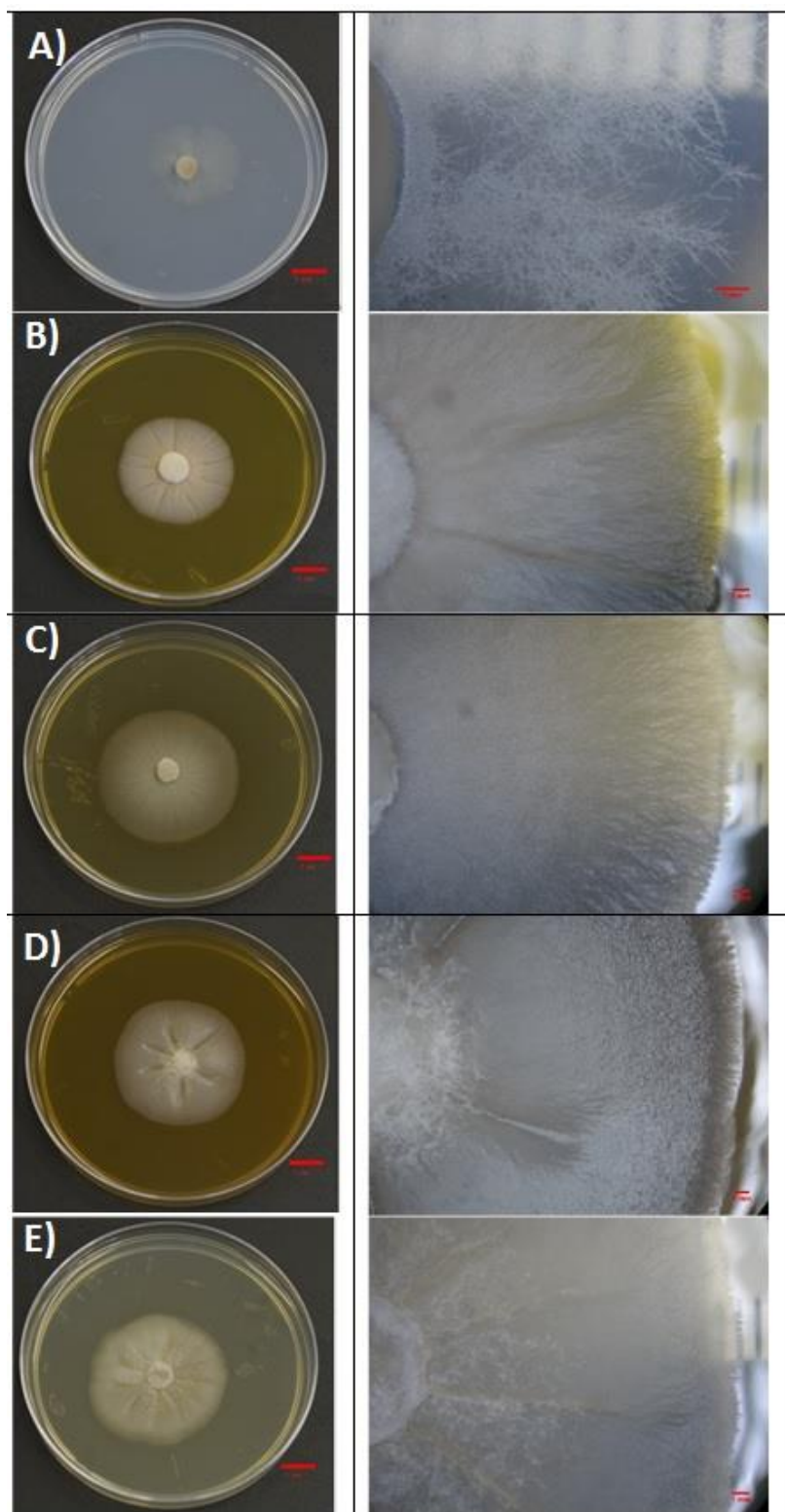


FIGURA 10: Macromorfologia do isolado LGMF1255 em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.
 Notas: Aspecto geral da colônia na coluna da esquerda (Barra de marcação = 1cm) e detalhes de crescimento da borda da colônia na coluna da direita (Barra de marcação = 1mm) nos seguintes meios A) Meio Mínimo. B) meio Sabouraud C) meio Citros D) meio MEA e E) BDA.

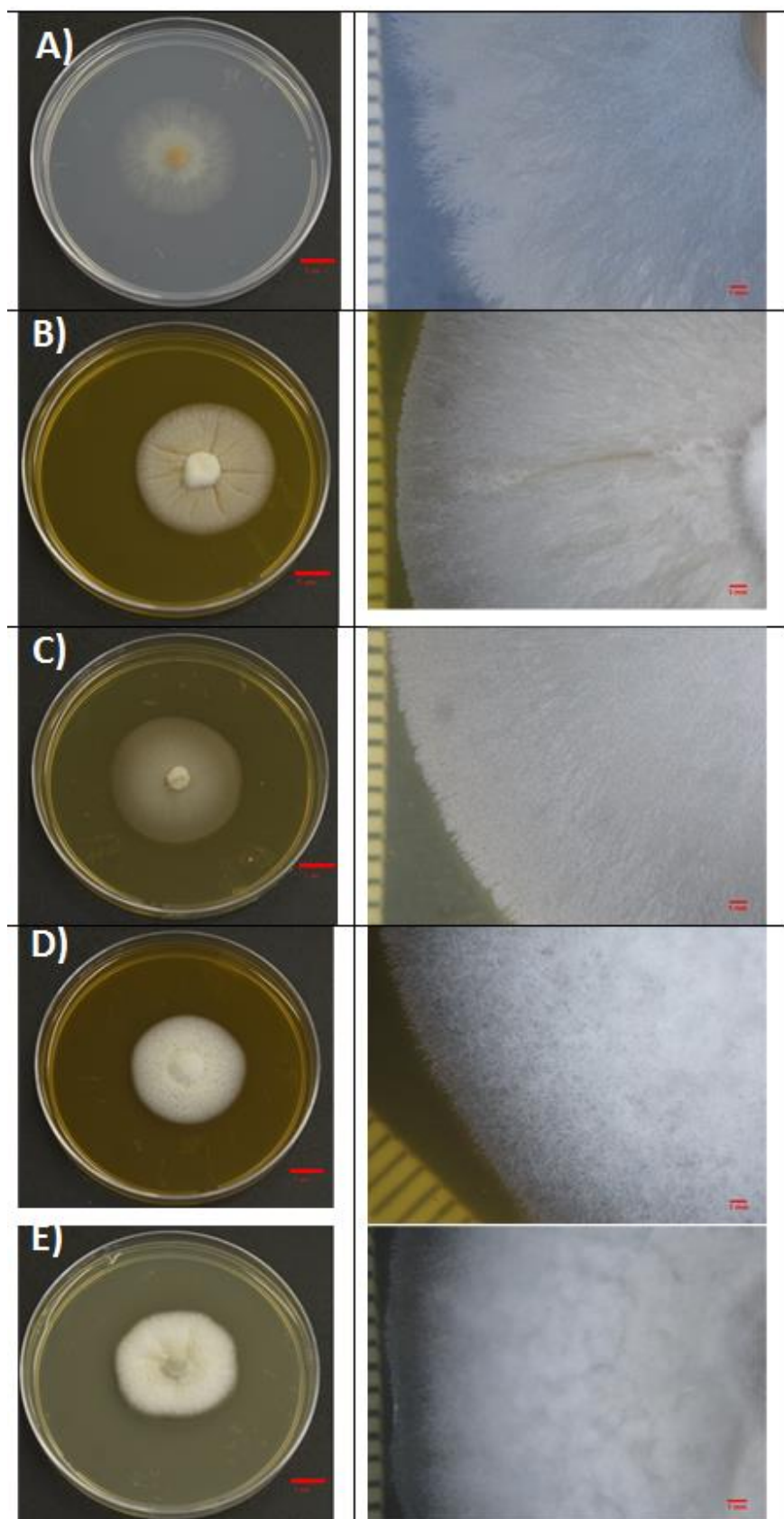


FIGURA 11: Macromorfologia do isolado *M. sutura* em diferentes meios de cultura após 10 dias de crescimento a 25 °C.

Notas: Aspecto geral da colônia na coluna da esquerda (Barra de marcação = 1cm) e detalhes de crescimento da borda da colônia na coluna da direita (Barra de marcação = 1mm) nos seguintes meios A) Meio Mínimo. B) meio Sabouraud C) meio Citros D) meio MEA e E) BDA.

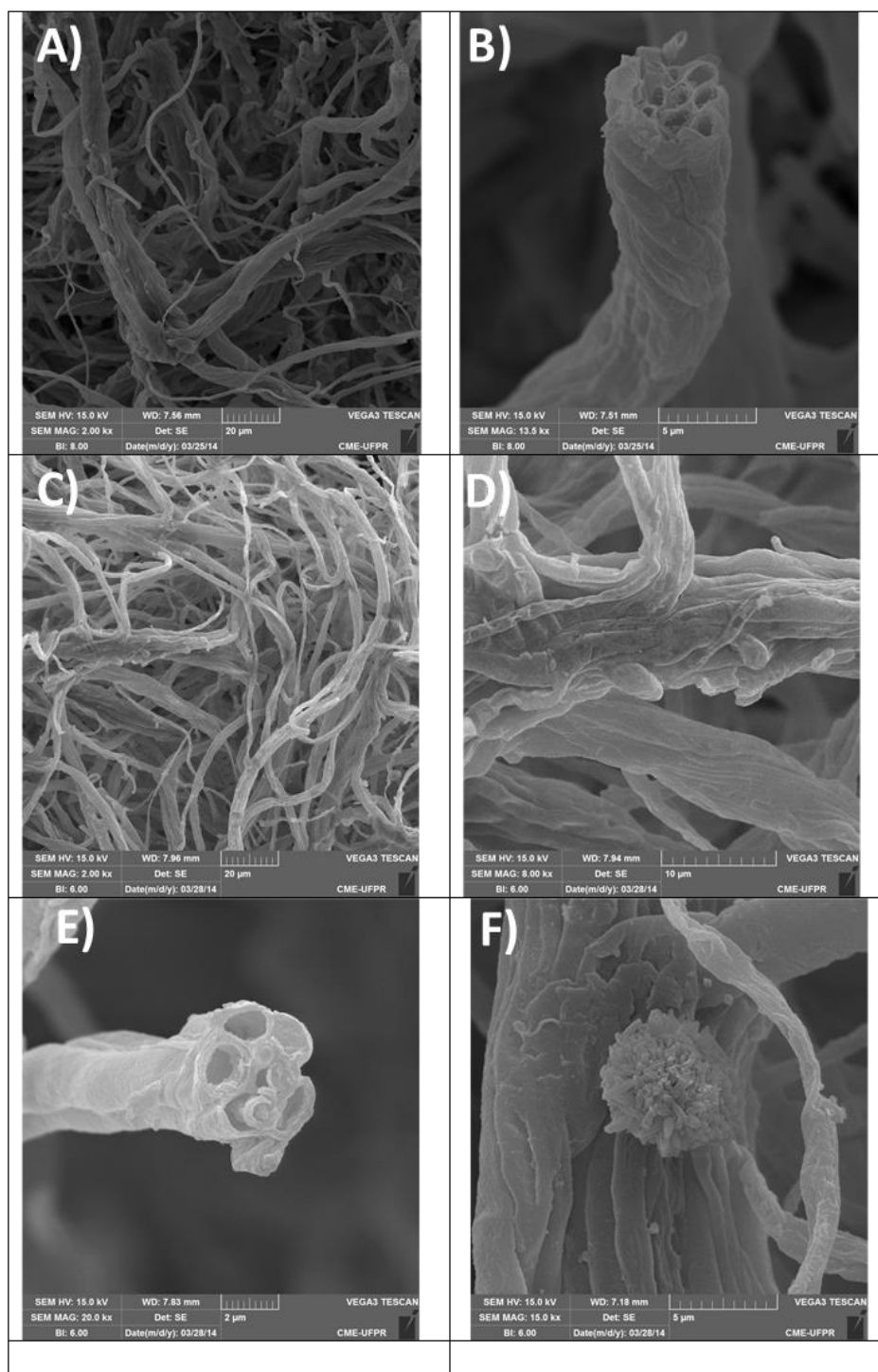


FIGURA 12: Micrografia eletrônica de varredura do isolado LGMF1254.

A) Eletromicrografia do micélio do fungo barra de 20 µm. B) Feixe de hifas cortadas com barra de 5 µm. C) Visão geral do micélio. D) Feixe de hifas com protuberâncias parecendo vesículas (barra de 10µm. E) Feixe de hifas cortadas com barra de 2µm. e F) Estrutura semelhante a *cauliflower-like* descrita por Mitchell *et al.*, 2008.

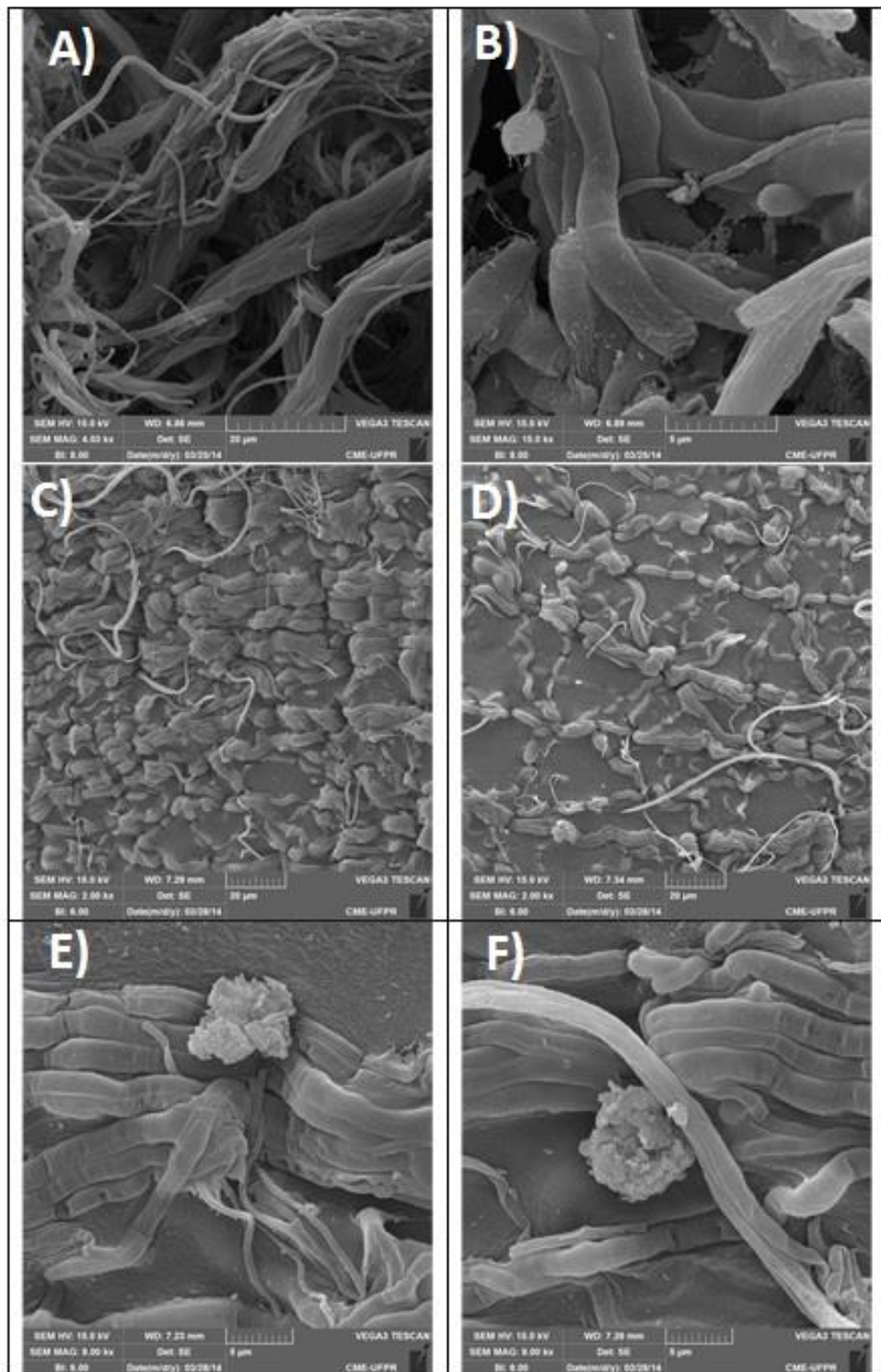


FIGURA 13: Micrografia eletrônica de varredura do isolado LGMF1255

A) eletromicrografia do micélio do fungo. B) Hifas com vesículas com barra de 10 μ m. C) Visão geral do micélio no meio de cultura. D) Hifas submersas no meio de cultura. E) Hifas submersas no meio de cultura e F) Estrutura parecida com *cauliflower-like* descrita por Mitchell *et al.*, 2008.

Caracterização dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255 do gênero *Muscodor*.

Os compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254 foram identificados por GC/MS. Confrontando os resultados gráficos de duas análises independentes do fungo LGMF1254 verificou-se que alguns compostos obtidos são os mesmos, como mostra a Figura 14. A identificação dos compostos pelo espectrômetro de massas foi feita pela comparação dos picos das possíveis clivagens da molécula com a Biblioteca NIST. Como exemplo pode-se observar a presença do composto Thujopseno na cromatografia gasosa (Figura 15) e no espectrômetro de massas (Figura 16).

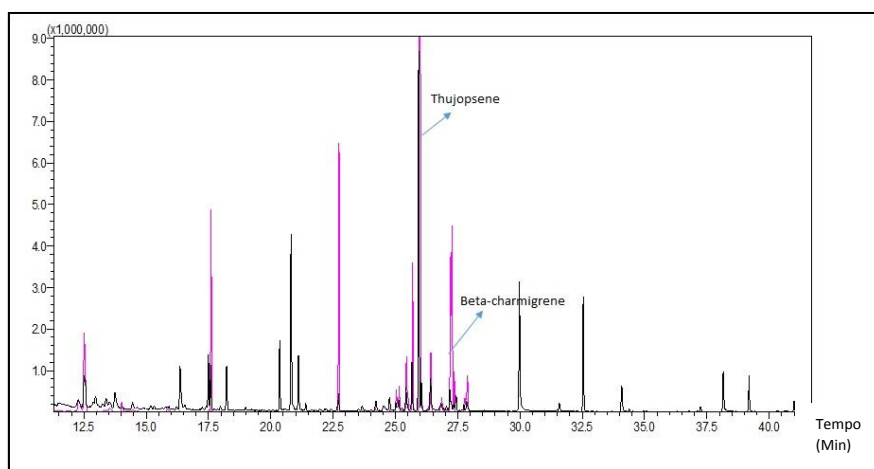


FIGURA 14: Cromatografia gasosa comparativa entre duas análises independentes (Rosa e Preta) dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254.

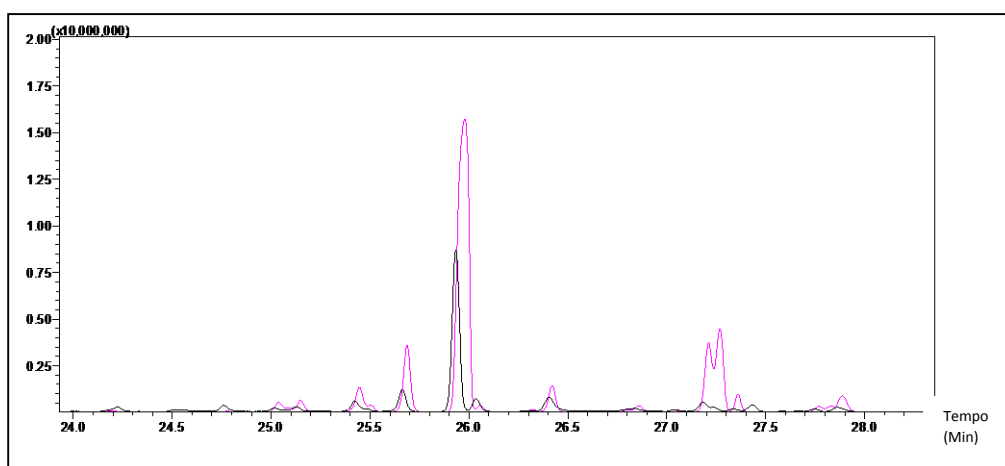


FIGURA 15: Cromatografia gasosa comparativa entre duas análises independentes (Rosa e Preta), com ênfase no composto majoritário Thujopseno

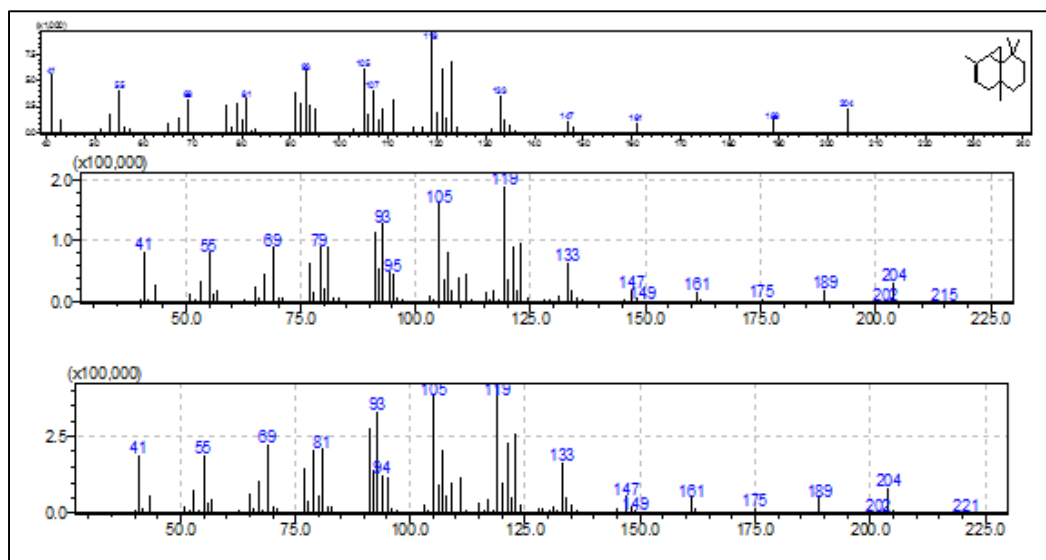
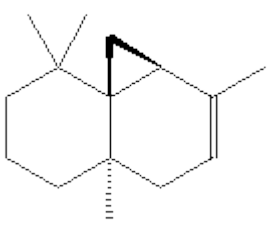
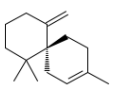
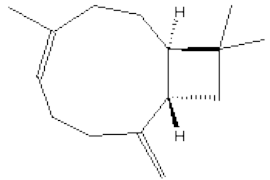
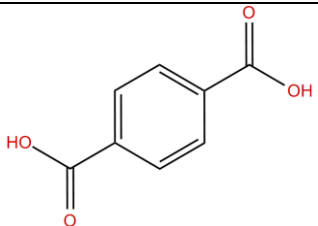
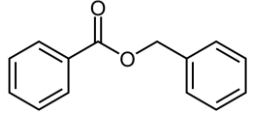


FIGURA 16: Espectrometria de massas comparando as amostras com a Biblioteca NIST
 A) Espectrômetro de massas encontrado na biblioteca NIST referente ao composto Thujopseno. B) Espectrômetro de massas observada em uma das análises do LGMF1254 (refere-se ao pico central, em preto, da imagem 16) C) Espectrômetro de massas observada em outra amostra independente do LGMF1254 (refere-se ao pico em rosa da imagem anterior).

No quadro 3 podem ser observados os compostos majoritários nas análises realizadas com o isolado LGMF1254 e uma análise do isolado LGMF1255. Os cromatogramas mostraram uma distribuição dos compostos a partir da qual estabeleceu-se um limite de detecção de 5%. Esse limite foi adotado porque na literatura os compostos que poderiam estar relacionados à inibição de algum patógeno estariam, em geral, em uma área relativa mínima de 10% na cromatografia gasosa. No entanto, nas amostras obtidas, foram poucas as identificações significativas, em relação aos dados fornecidos pela biblioteca do NIST, a partir da espectrometria de massas. Dessa maneira, para abranger uma maior quantidade de compostos identificados, e levando em consideração também algumas variações possíveis da técnica, o limiar foi reduzido a 5% (Quadro 3).

Nome do composto	Índice de Retenção	Estrutura	Isolados
Thujopseno	25.97		LGMF1254 LGMF1255
Beta-charmigreno	27.18		LGMF1254
Cariofileno	27.2		LGMF1254
Ácido benzenodicarboxílico	29.98		LGMF1254 LGMF1255
Benzilbenzoato	34.04		LGMF1254

Quadro 3: Compostos orgânicos Voláteis produzidos pelo *Muscodor*, isolado LGMF1254 e LGMF1255.

Identificados pela análise em SPME/GC/MS no banco de dados NIST que apresentaram área relativa maior do que 5%.

DISCUSSÃO

Entre os fungos endofíticos com ação antimicrobiana tem se destacado o gênero *Muscodor* descrito em 2001 (WORAPONG *et al.*, 2001). Os compostos orgânicos voláteis produzidos por este gênero têm demonstrado efeito inibitório e até mesmo letal para diversos microrganismos, patógenos humanos e de plantas (DAISY *et al.*, 2002, BANERJEE *et al.*, 2010, KULDALKAR *et al.*, 2011, MESHAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Nos experimentos realizados neste trabalho o isolado LGMF1254, identificado como pertencente ao complexo *Muscodor vitigeus latu sensu*, isolado de *Citrus sinensis*, apresentou ação inibitória no crescimento do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. A maioria dos inóculos de *P. citricarpa* expostos aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelo fungo não apresentou crescimento, assim como não houve produção de picnídios, o que caracteriza a ação fungicida do isolado LGMF1254 contra o fitopatógeno.

O isolado LGMF1254 foi utilizado para bioprospectar mais um isolado do gênero *Muscodor* de *Schinus terebinthifolius* Raddi, árvore com propriedades medicinais conhecida como aroeira, seguindo metodologia descrita por Zhang *et al.* (2010), denominado neste trabalho de LGMF1255. Em testes iniciais este isolado também apresentou resultados promissores na inibição do crescimento micelial de *P. citricarpa*.

A caracterização do gênero *Muscodor* tem sido feita por diferenciação morfológica, caracterização dos COVs e também pelo sequenciamento parcial da região ITS do rDNA (WORAPONG *et al.*, 2002, ATMOSUKARTO *et al.*, 2005, MITCHELL *et al.*, 2008, GONZÁLEZ *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2010, KUDALKAR *et al.*, 2010, SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Na comparação dos isolados LGMF1254 e LGMF1255, com a descrição da morfologia deste gênero na literatura, pode-se observar que eles são compatíveis com o gênero *Muscodor*. Foram realizados experimentos do mesmo fungo em diferentes meios de cultura com os dois isolados e o isolado *M. sutura*, e nos resultados constatou-se uma variação significativa de maior crescimento do isolado *M. sutura* em meio Mínimo.

Em experimento de crescimento em diferentes temperaturas dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* foram detectadas diferenças no crescimento. O isolado *M. sutura* apresentou o melhor crescimento a 28°C. Temperatura diferente da utilizada por Kudalkar *et al.* (2012) quando descreveram esta espécie e utilizaram a temperatura de 23°C para crescimento deste fungo. Em trabalho de investigação da melhor temperatura de crescimento de 5 isolados de *M. fengyangensis*, um isolado de *M. albus* (9-6) e *Muscodor* sp. (1 S18-3-1) também em BDA, os autores relataram que os 5 isolados de *M. fengyangensis*, apresentaram melhor crescimento a 25°C e a taxa de crescimento diminuiu acima desta temperatura (ZHANG *et al.*, 2010). Os mesmos

autores relataram que estes isolados não eram capazes de crescer acima de 30°C. Já o isolado *Muscodor* sp. apresentou o melhor crescimento a 28°C e resultados semelhantes foram obtidos para o isolado de *M. albus*. Estes isolados também foram capazes de crescer em temperatura acima de 30°C. O isolado LGMF1254 apresentou o melhor crescimento a 23°C porém, a 28°C seu crescimento apesar de menor ainda foi superior ao isolado LGMF1255 sendo que nestas temperaturas as diferenças foram significativas. O isolado LGMF1255 apresentou crescimento semelhante ao *M. sutura* a 23°C porém, a 28°C a diferença entre eles foi muito grande. Enquanto esta temperatura foi a melhor para *M. sutura*, o isolado LGMF1255 foi o que apresentou o pior crescimento. Estes resultados denotam a importância de uma avaliação de diferentes temperaturas de incubação para gerar o maior crescimento micelial deste gênero. A temperatura de crescimento e a capacidade de sobreviver a variação de temperatura destes fungos deve ser levada em consideração, principalmente quando este tem utilização no controle biológico. Trabalhos futuros devem investigar se proporcional ao crescimento micelial há diferenças quantitativas na emissão de voláteis. A maioria dos trabalhos utilizou a temperatura de 23°C para o crescimento visando a análise de voláteis de *Muscodor* spp (STROBEL *et al.*, 2001, KUDALKAR *et al.*, 2003, EZRA; HESS; STROBEL, 2004).

. Quanto à microscopia eletrônica de varredura tanto o isolado LGMF1254 quanto o LGMF1255 apresentaram estruturas já descritas na literatura como determinantes importantes para a identificação do gênero. A microscopia mostrou micélio bastante emaranhado, sem alguma organização específica, algumas protuberâncias nas hifas, como se fossem vesículas, e também uma estrutura, descrita pela primeira vez em *M. crispans*, que parecem ser florescências, sem no entanto ser estruturas reprodutivas, característica que está ausente para este gênero.

O sequenciamento da região ITS, realizado nos dois isolados obtidos neste trabalho, confirmou o gênero *Muscodor*; no entanto não permitiu que fosse identificada a espécie, por não apresentar diferenças com relação às sequências de *M. sutura* e *M. vitigenus*. Como alternativa para resolver a espécie destes isolados realizou-se o sequenciamento parcial do gene *rpb2* da RNA polimerase II, que já possui algumas sequências para este gênero depositadas no GenBank. Foram constatadas transições e uma transversão na sequência de *M. sutura* comparada às sequências dos isolados LGMF1254 e LGMF1255. Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 apresentaram sequências iguais. Essa diferença poderia sugerir que os isolados LGMF1254 e

LGMF1255 não são da mesma espécie de *M. sutura*, ou que estas diferenças seriam variações intraespecíficas. O sequenciamento desta região de *M. vitigenus* não se encontra disponível para comparação. Sendo a descrição de *M. vitigenus* (DAISY *et al.*, 2002) anterior à de *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012) sugere-se que, até estudos mais aprofundados na filogenia deste gênero, os isolados LGMF1254, LGMF1255 e o *M. sutura* se mantenham agrupados juntamente com o isolado de referência de *M. vitigenus* e esse grupo seja denominado de *Muscodor vitigenus latu sensu*.

Os autores distinguem *M. sutura* de *M. vitigenus* por apresentarem variações na morfologia e pela produção de diferentes compostos voláteis majoritários (DAISY *et al.*, 2002, KUDALKAR *et al.*, 2010), mesmo apresentando identidade total na região ITS sequenciada. Recentemente mais um isolado denominado *M. equiseti* também apresentou identidade total no sequenciamento da região ITS com este grupo e foi identificado como uma outra espécie devido ao COV majoritário produzido ser distinto (ácido 2 metil propanoico) e ter sido isolado de outro hospedeiro (*Equisetum debile*) (SUWANNARACH *et al.*, 2013). Este isolado não foi incluído neste estudo pois a o número de depósito no GenBank descrita no artigo não corresponde ao organismo. Na análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos fungos, o principal composto produzido por *M. vitigenus* é o *Naftaleno* que apresenta ação inseticida (DAISY *et al.*, 2002), enquanto que os principais voláteis produzidos por *M. sutura* são o 2 metil-ácido propanóico e o *Thujopseno* que apresenta ação antifúngica (KUDALKAR *et al.*, 2012). Segundo relato de Kudalkar *et al.* (2010), o composto naftaleno também se encontra presente em *M. sutura* porém em pequena quantidade.

Na análise dos voláteis produzidos pelos isolados LGMF1254 e LGMF1255 foi possível identificar alguns compostos tais como Beta-Chamigreno, benzil benzoato e também o composto majoritário Thujopseno sendo este último produzido pelos dois isolados testados. O composto Thujopseno, classificado como um sesquiterpeno, tem sua principal importância por apresentar ação antimicrobiana (POLIZZI *et al.*, 2011).

Sesquiterpenos se caracterizam por apresentarem 15 átomos de carbono, que são facilmente detectados e podem ser encontrados no ambiente e em uma grande diversidade de organismos, incluindo fungos e bactérias (POLIZZI *et al.*, 2011).

A formação de sesquiterpenos, como metabólitos secundários, depende das condições de crescimento, desde temperatura, pH, umidade, substrato de crescimento, entre outros. Kramer e Abraham (2012) discutem que não é possível

assumir um determinado composto orgânico volátil como característica determinante de uma espécie.

Considerando o potencial biotecnológico deste gênero, principalmente pela possibilidade de uso como agente de controle biológico, é necessário um aprofundamento nas pesquisas filogenéticas deste grupo.

5 DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos os estudos de fungos endofíticos com ação antimicrobiana em patógenos bacterianos e fúngicos têm aumentado significativamente (STROBEL *et al.*, 2004; STROBEL, 2006, FIGUEIREDO *et al.*, 2007; SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014). O gênero *Muscodor*, descrito em 2001 (WORAPONG *et al.*, 2001), destaca-se nesta área pois produz compostos orgânicos voláteis com ação antimicrobiana, tendo efeito inibitório ou até mesmo letal para vários patógenos importantes para a saúde humana e também para plantas (DAISY *et al.*, 2002; BANERJEE *et al.*, 2010; KULDALKAR *et al.*, 2011, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Nos experimentos de antagonismo realizados nesse estudo, o isolado LGMF1254, identificado como *Muscodor vitigenus latu sensu*, isolado de *Citrus sinensis*, apresenta ação inibitória no crescimento do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, causador da pior doença fúngica em citros na atualidade. Constatou-se que a maioria dos inóculos deste fitopatógeno não apresentou qualquer crescimento após exposição aos compostos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254. Em condições favoráveis para a produção de picnídios pelo fitopatógeno (BALDASSARI; REIS; GOES, 2009) quando houve co-cultivo com o fungo *Muscodor* LGMF1254 os picnídios não foram produzidos, pois nem mesmo o inóculo inicial se desenvolveu. Desta forma, constatou-se a influência dos compostos orgânicos voláteis (COV) no desenvolvimento do fitopatógeno *P. citricarpa*. Com estes dados foi possível constatar a ação fungicida dos COVs para este fitopatógeno. Os poucos isolados que apresentaram crescimento após cinco ou dez dias de exposição aos voláteis (menos de 5% do total de inóculos) apresentaram pequeno crescimento micelial que podem ser explicados pela concentração insuficiente dos compostos na placa, pelo tempo de crescimento do endofítico, por má vedação das placas ou por algum outro motivo não detectado. Como qualquer fungicida, a ação eficiente deste é dependente de uma concentração mínima. Stemmler *et al.*, em 2013, testaram a concentração dos fungicidas Pyraclostrobin e Azoxystrobin na inibição do crescimento do fungo *Phyllosticta citricarpa* e definiram que a concentração para uma inibição total do fungo seria de 3 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente.

Em virtude do grande potencial deste isolado de *Muscodor* LGMF1254, primeiro descrito no Brasil, outras espécies vegetais foram bioprospectadas para isolamento deste gênero. Semelhante ao executado por Zhang *et al.*, 2010, uma vez que o *Muscodor* não inibe outro isolado do mesmo gênero, foi utilizado o próprio isolado LGMF1254 na placa para inibir o crescimento de outros fungos e permitir o crescimento de outros isolados deste mesmo gênero. Com esta estratégia foi obtido mais um isolado de *Muscodor* da planta medicinal Aroeira (*Schinus terebinthifolius*), identificado por morfologia, produção de COVs e sequenciamento parcial da região ITS do DNA ribossômico. Este isolado, denominado neste trabalho LGMF1255, também apresentou resultados promissores na inibição do crescimento micelial do fungo *P. citricarpa* em testes iniciais.

A identificação do gênero *Muscodor* é bastante complexa devido à falta de estruturas reprodutivas. Desta forma, a caracterização tem sido feita por diferenciação da morfologia micelial, muitas vezes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por caracterização de compostos orgânicos voláteis produzidos por esses fungos. Em todos os trabalhos publicados até o momento, o sequenciamento parcial da região ITS do DNA ribossômico tem sido fundamental na confirmação deste gênero (WORAPONG *et al.*, 2002; ATMOSUKARTO *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; KUDALKAR *et al.*, 2010; SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014; MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Na comparação dos isolados LGMF1254 e LGMF1255 com a descrição da morfologia deste gênero na literatura foi possível observar, pelo aspecto esbranquiçado da colônia e, principalmente, pela ausência de produção de esporos em diferentes meios de cultura, que estes isolados são compatíveis com o gênero *Muscodor*. Em relação à fisiologia foi constatada também a ação antimicrobiana por compostos voláteis destes isolados contra *P. citricarpa*, semelhante à já descrita na literatura para outros fitopatógenos (ATMOSUKARTO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014; MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2014).

Baseados em relatos de Meshram; Kapoor; Saxena em 2013, que observaram modificações nas colônias bem como diferenças na velocidade de crescimento do mesmo fungo em diferentes meios, foram realizados experimentos com os isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* em vários meios de cultura.

Nesses experimentos pode-se constatar um crescimento superior do isolado *M. sutura* em relação aos demais isolados em meio mínimo, sendo que nos demais meios as variações não foram significativas após dez dias de crescimento. As colônias dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* apresentaram algumas variações na densidade do micélio detectadas por inspeção visual sem, no entanto apresentarem diferenças significativas de crescimento.

Em experimento de crescimento em diferentes temperaturas dos isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* foram detectadas diferenças no crescimento. O isolado *M. sutura* apresentou o melhor crescimento a 28°C. Temperatura diferente da utilizada por Kudalkar *et al.* (2012) quando descreveram esta espécie e utilizaram a temperatura de 23°C para crescimento deste fungo. Em trabalho de investigação da melhor temperatura de crescimento de 5 isolados de *M. fengyangensis*, um isolado de *M. albus* (9-6) e *Muscodor* sp. (1 S18-3-1) também em BDA, os autores relataram que os 5 isolados de *M. fengyangensis*, apresentaram melhor crescimento a 25°C e a taxa de crescimento diminuiu acima desta temperatura (ZHANG *et al.*, 2010). Os mesmos autores relataram que estes isolados não eram capazes de crescer acima de 30°C. Já o isolado *Muscodor* sp. apresentou o melhor crescimento a 28°C e resultados semelhantes foram obtidos para o isolado de *M. albus*. Estes isolados também foram capazes de crescer em temperatura acima de 30°C. O isolado LGMF1254 apresentou o melhor crescimento a 23°C porém, a 28°C seu crescimento apesar de menor ainda foi superior ao isolado LGMF1255 sendo que nestas temperaturas as diferenças foram significativas. O isolado LGMF1255 apresentou crescimento semelhante ao *M. sutura* a 23°C porém, a 28°C a diferença entre eles foi muito grande. Enquanto esta temperatura foi a melhor para *M. sutura*, o isolado LGMF1255 foi o que apresentou o pior crescimento. Estes resultados denotam a importância de uma avaliação de diferentes temperaturas de incubação para gerar o maior crescimento micelial deste gênero. A temperatura de crescimento e a capacidade de sobreviver a variação de temperatura destes fungos deve ser levada em consideração, principalmente quando este tem utilização no controle biológico. Trabalhos futuros devem investigar se proporcional ao crescimento micelial há diferenças quantitativas na emissão de voláteis. A maioria dos trabalhos utilizou a temperatura de 23°C para o crescimento visando a análise de voláteis de *Muscodor* spp (STROBEL *et al.*, 2001, KUDALKAR *et al.*, 2003, EZRA; HESS; STROBEL, 2004). Chaverri e Samuels, em 2004, sugerem que a temperatura ótima de crescimento seja um dos critérios de determinação de

espécies, principalmente em gêneros com dificuldades de identificação como é caso dos fungos de *Muscodor*.

Na microscopia eletrônica de varredura observaram-se características semelhantes às já descritas na literatura para o gênero. Estruturas semelhantes a vesículas foram observadas nos isolados LGMF1254 e LGMF1255 assim como em *M. yucatanensis* (GONZÁLEZ *et al.*, 2009). Em *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012, *M. crispans* (MITCHELL *et al.*, 2008) e *M. tigerri* (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2014) foram descritas hifas com florescências, semelhantes a couve-flores (*cauliflower-like*) (MITCHELL *et al.*, 2008) que também foram observadas nos dois isolados brasileiros. Já hifas circulares como anéis descritas em *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012) e *M. yacatanensis* (GONZÁLEZ *et al.*, 2009) não foram visualizadas nas análises realizadas nos isolados deste trabalho. Durante o processo de microscopia pode-se medir o diâmetro de hifas cortadas e foi verificado que a média do diâmetro das hifas do LGMF1254 foi de 1,45 µm e do LGMF1255 de 1,34 µm. Na descrição de *M. sutura*, foram identificadas hifas com diâmetro variando entre 0,9 a 2 µm (KUDALKAR *et al.*, 2012).

Para identificação dos isolados LGMF1254 e LGMF1255, a região ITS foi parcialmente sequenciada e foi confirmado que os isolados são do gênero *Muscodor*. No entanto, não pode-se identificar a espécie destes pois os isolados LGMF1254 e LGMF1255 estão no mesmo clado que as espécies *Muscodor sutura* e *Muscodor vitigenus*. As quatro sequências apresentam identidade absoluta na região ITS. Desta forma foi possível constatar que apenas com a análise do sequenciamento da região ITS não é possível separar algumas espécies deste gênero. Quando o sequenciamento de ITS não é efetivo para estabelecer uma diferenciação entre espécies é necessário abranger o sequenciamento para outras regiões, sendo o ideal o sequenciamento multigênico (ZHANG *et al.*, 2010).

No presente trabalho foi feito o sequenciamento parcial do gene *rpb2* da RNA polimerase II que já tem algumas sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para este gênero. Outras sequências utilizadas em análise multilocos como do gene da beta-tubulina ou EF (*Elongation factor*) ainda não estão em bancos de dados disponíveis para isolados deste gênero. Na análise dos resultados do sequenciamento de *RPB2* verificou-se que os isolados LGMF1254 e o LGMF1255 apresentam a mesma sequência enquanto o isolado de *M. sutura* apresentou variações devido a transições e uma transversão nesta

sequência. A constatação destas diferenças no sequenciamento do isolado *M. sutura* e os isolados LGMF1254 e LGMF1255 poderia sugerir que estes isolados não são a mesma espécie de *M. sutura* ou que estas diferenças sejam referentes a variações intraespecíficas. Zhang *et al.*, 2010, na distinção da espécie *M. fengyangensis* utilizando sequenciamento da parcial do gene *rpb2* obteve cinco isolados distintos com variações intraespecíficas.

Como o sequenciamento parcial do gene *rpb2* de *M. vitigenus* não se encontra disponível no banco de dados e tampouco na literatura não foi possível uma comparação com o sequenciamento dos isolados deste trabalho. Sendo a descrição de *M. vitigenus* (DAISY *et al.*, 2002) anterior à de *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012) sugere-se que até estudos mais aprofundados na filogenia deste gênero, os isolados LGMF1254, LGMF1255 e o *M. sutura* se mantenham agrupados junto à sequência de referência de *M. vitigenus*, e esse grupo seja denominado de *Muscodor vitigenus latu sensu*.

Os autores distinguem *M. sutura* de *M. vitigenus* por apresentarem variações na morfologia e pela produção de diferentes compostos voláteis (DAISY *et al.*, 2002, KUDALKAR *et al.*, 2010), mesmo apresentando identidade total na região ITS sequenciada. *M. equiseti* também apresenta identidade total no sequenciamento da região ITS e foi caracterizado como outra espécie devido à produção de um composto orgânico volátil majoritário distinto (ácido 2 metil propanoico) e ter sido isolado de outra planta (*Equisetum debile*) (SUWANNARACH *et al.*, 2013). Na análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos fungos, o principal composto produzido por *M. vitigenus* é o Naftaleno que apresenta ação inseticida (DAISY *et al.*, 2002), enquanto que os principais voláteis produzidos por *M. sutura* são o 2 metil-ácido propanóico, e o *Thujopseno*, que apresenta ação antifúngica (KUDALKAR *et al.*, 2012). Segundo relato de Kudalkar *et al.*, 2010, o composto naftaleno também se encontra presente em *M. sutura* porém em pequena quantidade.

Neste trabalho análises preliminares de uma possível ação inseticida do isolado LGMF1254 com o inseto *Drosophilla melanogaster* foram realizadas, porém não verificou-se ação inseticida (dados não mostrados). Na análise dos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254 e pelo LGMF1255 foi possível identificar alguns compostos tais como Beta-Chamigrene, benzyl benzoate e também o composto majoritário Thujopseno, sendo este último produzido por ambos. Na literatura, o composto Thujopseno, classificado como um sesquiterpeno, é estudado há bastante

tempo (ERTMAN; NORIN, 1959) e sua principal importância é apresentar ação antimicrobiana (POLIZZI *et al.*, 2011).

Sesquiterpenos são uma classe de compostos que se caracterizam por apresentar 15 átomos de carbono, verdadeiros esqueletos de carbono. Estes são facilmente detectados, e podem ser encontrados no ambiente e em uma grande diversidade de organismos, incluindo fungos e bactérias (POLIZZI *et al.*, 2011).

Há uma ampla variação na formação de sesquiterpenos como metabólitos secundários e dependem das condições de crescimento, desde temperatura, pH, umidade, substrato de crescimento, entre outros. Kramer e Abraham (2012) discutem que não é possível assumir um determinado composto orgânico volátil como característica determinante de uma espécie.

Considerando o potencial biotecnológico deste gênero, principalmente pela possibilidade de uso como agente de controle biológico, é necessário um aprofundamento nas pesquisas filogenéticas deste grupo. Porém, por vários isolados estarem em processos de patentes, a análise completa de todos os fungos deste grupo se torna complexa.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os isolados LGMF1254 e LGMF1255 estudados neste trabalho são do gênero *Muscodor*.

Os isolados LGMF1254 e LGMF1255 são os primeiros do gênero *Muscodor* relatados no Brasil e os compostos orgânicos voláteis de ambos apresentam atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*.

No que se refere à caracterização de espécies do gênero *Muscodor*, os procedimentos realizados neste trabalho, permitem afirmar que os isolados LGMF1254 e LGMF1255 pertencem ao mesmo clado das espécies *M. sutura* e *M. vitigenus* no entanto não é possível determinar qual das espécies esse isolado pertence. São necessários estudos mais aprofundados na filogenia deste gênero para estabelecer uma caracterização de espécies. Até a realização destes estudos sugere-se que os isolados LGMF1254, LGMF1255 e *M. sutura* se mantenham agrupados junto à sequência referência de *M. vitigenus* sendo esses isolados denominados de *M. vitigenus latu sensu*.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 5ª ed. New York: Garland, 2010.

AMIN, F.; RAZDAN, V. K.; MOHIDDIN, F. A.; BHAT, K. A. and SHEIKH, P.A. Effect of Volatile Metabolites of Trichoderma Species Against Seven Fungal Plant Pathogens In-vitro. **Journal of Phytology** 2(10), p.34-37, 2010

AMORIM, Lilian (Org.) ; REZENDE, J. A. M. (Org.) ; Bergamin Filho, Armando (Org.) . Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2010. v. 1. 704 p.

AVENA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**: v.15, p.468-475, 1940.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M., Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**. Polônia, V.45, n1 p. 3-15, 2004

ATMOSUKARTO, I; CASTILLO.U; HESS,W.H, SEARS.J; STROBEL,G. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. **Plant Science** 169,854–861, 2005.

AZEVEDO, J.L. Fungos – Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** no 1. Ano 1,1997.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos**, 2a ed., Editora UFG, 2008

AZEVEDO, J.L.; ESPOSITO E. Fungos – **Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2a. Edição. Caxias do Sul: Educs, 2010.

BALDASSARI, R.B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Eur J Pathol** 123, p 1-4, 2009.

BANERJEE, D.; STROBEL, G.; GEARY, B.; SEARS, J.; EZRA, D.; LIARZI, O. and COOMBS, J. *Muscador albus* strain GBA, and endophytic fungus of *Ginkgo biloba* from United States of America, produces volatile antimicrobials. **Mycology**, p. 1-8, 2010.

BASIM, H.; OZTORK, S.B.; YEGEN, O. Efficacy of a biological fungicide (Planter Box (*Trichoderma harzianum* Rifai T-22)) against seedling root rot pathogens (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.) of cotton. GAP-Environmental Symposium, Turkey. p. 137-144, 1999

BERGAMIN, A.; KIMATI, H. **Manual de Fitopatologia** - Vol I. Ed. Agronômica Ceres. São Paulo. 1995.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 33-52, 1991.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas** 17, p.111- 147, 2009

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice, of biological control of plant pathogens**. The American Phytopathological Society. pág. 539, 1983.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K. and RUNYON, J.B. Naphthalene, and insect repellent, is produced by *Muscador vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology** 148, p. 3737-3741, 2002.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Tabela: **Produção brasileira de laranja em 2012**: Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Laranja_Brasil_2012.pdf. Acesso em: fev/2014.

ERTMAN, E. NORIN, T. The identity of Thujopsene and Widdrene and of Hinokiie and Widdrenic Acids. **ACTA Chemica Scandinavica** nº14 pp 1124-1128, 1959

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ed. Revisada e ampliada: Educ, 2010.

EZRA, D.; HESS, W.M.; STROBEL, G. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, 150, 4023-4031, 2004.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effects of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant science** 165, p. 1229-1238, 2003

FAO, 2010. Food and Agricultural commodities production Disponível em:
< <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA&subject=4>>.
Acesso em:20/09/2012.

FEICHTENBERGER, E. **Mancha preta ou pinta preta dos citros**. Laranja & Cia. v. 43, p. 10-11, 1996.

FIGUEIREDO J.G., PIMENTEL I.C., VICENTE V.A., PIE M.R., KAVA-CORDEIRO V., GALLI-TERASAWA L.V.; PEREIRA J.O., SOUZA A.Q.L.; GLIENKE, C; High diversity and bioprospecting endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. *Canadian Journal Microbiology* 53: 1123-1132. 2007.

FIRÁKOVA, S.; STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M., Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants, *Biologia*, Bratislava, Section Botany 63/3:251-257, 2007.

FISCHER. I. H; ZANETTE, M. M; SPÓSITO, M. B; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja 'Valência' e caracterização da população fungica em pomares orgânicos e convencionais. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 6, 390-399, 2011.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2ª edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 3ª edição. FUNPEC- Editora, 2009.

GABLER, F.M.; MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J. I; SMILANICK, J.L., Interaction of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone

or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**. 55, p.78-84, 2010.

GAJERA, H.; DOMADIYA, R.; PATEL, S.; KAPOPARA, M.; GOLAKIYA, B. Molecular mechanism of trichoderma phytopathogen as bio-control agents against phytopathogen system – a review. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, vol 1, No 4, p. 133-142, 2013

GARCIA, A.; RHODEN, S.A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI, R.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** Vol 2 (10), pp 035-044, October, 2012.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guinarcia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetic and molecular biology*, 25 p. 251-255, 2002.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D. *et al.* Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 47-5, 2011.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINNOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**. v.92, pág. 976-985, 2002.

GONZÁLEZ, M. C, ANAYA, A.L.; GLENN, A. E., MARCIAS-RUBAICAVA.M.L., HERNANDEZ-BAUTISTA, B., HANLIN, R. T. *Muscodor yucatanensis*, new endophytic ascomycete from Mexican chakah, bursera simaruba. **Mycotaxon**, v.110, pp. 363-372, 2009.

HALL, T. A. **BioEdit4.8**. Raileigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.

JUNG, L. F. **FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS NO CONTROLE DE *Phyllosticta citricarpa***. Dissertação, (Mestrado em Genética de Microrganismos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KELEMU, S; WHITE Jr, J.F; MUÑOZ, F. TAKAYAMA, Y. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: Isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. **Can. Microbiol.** 47: 55- 62, 2001.

KIMATI, H, BERGAMIN FILHO A, AMORIM L. Manual de Fitopatologia. 4a.ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres, v. 2. **Doenças das Plantas Cultivadas**. p. 261-263, 2005.

Kloepper J W and Beauchamp C J A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Can. J. Microbiol** 38, 1219–1232, 1992.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945–950, 1981. Disponível em: http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n12_945.pdf Acesso em: 12/12.

KRAMER, R., ABRAHAM, W, R. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for ?. **Phytochem Rev.** V. 11, p.15-37, 2012.

KUDALKAR, P.; STROBEL, G.; UL-HASSAN, S. R.; GEARY, B. *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. **Mycoscience** 53, p. 319-325, 2012.

LARSEN, T.O.; FRISVAD, J. C. Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. , Jour. Microbiol. Methods, 24, p. 135-144, 1995.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, v. 57, p. 261-265, 2001.

- LI, Q., NING, P., ZHENG, L., HUANG, J., LI, G., HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological control**. 61: 113 -120, 2012.
- LIU, W.J.; WHELEN, S.; HALL, B.D., Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. **Mol. Biol. Evol.** 16 (12):1799-1808,1999.
- MARIANO, R.L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. I, p.369-409,1993.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 262, 1998
- MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. **Micologia: Avanços no conhecimento**. Recife: ED. Universitária da UEPE, p. 129-140, 2007.
- MESKRAM, V., KAPOOR, N., SAXENA, S., Muscodor Kashayum sp. Nov. – a new volatile antimicrobial producing endophytic fungus. **Mycology**, V. 4, Nº 4, 196- 204, 2014.
- MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; VARGAS, P. N. and EZRA,D. *Muscodor crispus*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity** 31, p. 37-43, 2008.
- NEVES, M.; TROMBIN, V.; MILAN, P.; LOPES, F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da Citricultura Brasileira**. São Paulo: Maskestrat, 138 p., 2010.
- NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *penicillium expansum* by plant volatile compounds. **Plant Pathology**, v.55, p. 100-105, 2006.
- NETO P. A. S. P; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos Interação com plantas e potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** no 29, 2002.

NUNES, W. M. C. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerinas “Montenegrina” no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 32, n.3, p. 295, julho/setembro, 2006.

PAL, K. K.; MCSPADDEN G. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor** DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.
Disponível em: <[http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/PHI BiologicalControl.pdf](http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/PHI%20BiologicalControl.pdf)>. Acesso em: 02/2013.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J VAN DEN (Eds), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge, U.K: Cambridge University Press, p.175-187, 1986.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. Pág.179-197, 1991.

PHONGPAICHIT, S.; NIKOM, J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J.; HUTADILOK- TOWATANA, N., RUKACHAISIRIKUL, V.; KIRTIKARA, K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 51: 517, 525, 2007.

PLAZA, P., USALL, J., TEIXIDÓ, N., & VIÑAS, I. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology**, 94(4), 549–54, 2003.

POLLIZI, V., FAZZINI, L., ADAMS, A., PICCO, A.M, SAEGER, S.D., PETEGHEM, C.V., KIMPE, N.D. Autoregulatory Properties of (+)-Thujopseno and influence of Environmental Condition on Its Production by *Penicillium decumbens*, **Microb. Ecol**, V.62 p.838-852, 2011.

POSSIEDE, Y.M.; GABARDO, J.; KAVA-CORDEIRO, VANESSA; GALLI-TERASAWA, L.V.; AZEVEDO, J.L.; GLIENKE, C. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 308-313, 2009.

PONTECORVO, G., J. A. ROPER, L. M. HEMMONS, K. D. MacDONALD and A. W. BUFTON, The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advan. Genet.* 5: 141-238, 1953

ROBINSON P.M., GARRETT, M. K. Identification of volatile sporostatic factors from cultures of *Fusarium oxysporum*. **Trans.Br.Mycol.Soc.**52 (2), 293-299, 1969.

ROBINSON P.M.; PARK, D. Volatile Inhibitors of spore Germination producer by fungi. Trans. Br. Mycol Soc. 49 (4) 639- 649, 1966.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. **A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro**. Comunicado Técnico. CTAA-EMBRAPA. v.19, p. 1-5, 1995.

RODRIGUEZ, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR- VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 323-327, 2007.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; TESLENKO, M. 2013 . Mr Bayes: Bayesian Inference of Phylogeny Disponível em: < <http://mrbayes.sourceforge.net/>>

RUDGERS, J. A.; KOSLOV, J. M. and CLAY. K. Endophytic fungi alter relationships between diversity ecosystem properties. **Ecology Letters** 7, p 42-51, 2004

SANTOS, A. Classificação de Fungicidas de Acordo com O Modo de Ação. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**. 2012 Disponível em: < http://www.uesb.br/utilitarios/modelos/monta.asp?site=fitopatologia&tex=ii_04_fungicida3.html >. Acesso em: 09/2012.

SAXENA, S., MESKRAM, V., KAPOOR, N., *Muscodor tigerii* sp, nov. - Volatile antibiotic producing endophytic fungus the Northeastern Himalayas. Annal of Microbiology, Março, 2014.

SCHNABEL, G.; MERCIER, J. Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. Postharvest Biology and Technology 42 p. 121 -123, 2006.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A; CHEN, W. and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**, vol 109, no. 16, p.6241-6246, 2012.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA:
American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; GOES, A.D.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha Preta Dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.45-64, 2009.

SPECIAN, V. SARRAGITTO, M.H.; PAMPHILE, J.A.; CLEMENTE, E. Chemical Characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe Helianthi* isolated from *Luehea divaricate*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 1174-1182, 2012.

STAMMLER, G; SCHUTTE, G.C; SPEAKMAN, J; MIESSNER, S; CROUS, P.W. Phyllosticta species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *Crop Protection* 48, p.6-12, 2013.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia Spp.* e *Phyllosticta Sp.* nos estados do Paraná e São Paulo**. 209 p. Tese de doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STROBEL, G; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. – Natural Products from Endophytic Microorganisms- **J. Nat. Prod.**, (67). 257-268, 2004.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 6, p. 535-44, 2003.

STROBEL, G.A. *Muscador* species- endophytes with biological promise. **Phytochem Rev.** 10:165–17, 2011.

STROBEL, G. A; DIRKSE, E.; SEARS, J. MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscador albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, 147, 2943-2950, 2001.

STROBEL, G.A.; KLUCK, K.; HESS, W.M.; SEARS, J.; EZRA, D.; VARGAS, P.M. *Muscador albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* marking volatile antibiotic: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant **Microbiology** 153, p. 2613-2620, 2007

SUTTON, B. C; WATERSON, J. M. ***Guignardia citricarpa***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 2 p. (Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 85) 1966.

SUWANNARACH, N.; BUSSABAN, B.; HYDE, K.; LUMYONG, S. *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from Cinnamomum bejolghota. Mycotaxon 114: 15–23. 2010.

SUWANNARACH, N., KUMLA, J., BUSSABAN, B., HYDE, K., MATSUI, K., LUMYONG, S. Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Mucodor* from northern Thailand. Annal of Microbiology, DOI 10.1007/s13213-012-0593-6. V. 63, Issue 4, pp 1341-1351, 2013

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M; KUMAR, S (2011) **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

TIMOSSI, A. J.; GOES, A.; KUPPER, K.C.; BALDASSARI, R. B.; REIS, R.F.- Influência da temperatura e da luminosidade no Desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, Agente causal da Mancha Preta dos Frutos Cítricos. **Fitopatol. Bras.** 28 (5), set- 08/2003.

TIMMER, L.W.; GERNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of Citrus Diseases** (Compendium of Plant Disease Series) 2^a Ed., 2010.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. Mycologia. Stanford, v. 82, p.218-226, 1990.

WORAPONG, J.; STROBEL, G; HESS, W.M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from Cinnamomum zeylanicum. Mycotaxon 79: 67-79. 2001.

WORAPONG, J.; STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.F.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. **Mycotaxon** 81: 463-475. 2002.

YUAN, Z.; SU, Z; MAO, L.; PENG, Y.; YANG, G.; LIN,; ZHANG, C. Distinctive Endophytic Fungal Assemblage in Stems of Wild Rice (*Oryza granulate*) in china with

special reference to two species of *Muscodor* (*Xylariaceae*) **The journal of Mycobiology** , vol 49 N°1 pp 15-23, 2011.

ZHANG; WANG; MAO; KOMON-ZELAZOWSKA; YUAN; LIN; DRUZHININA; KUBICEK. *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. **Fungal Biology** 114: 797-808, 2010.

ZOU, W.X.; TAN, R.X., Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep., 18, p. 448-459, 2001

APÊNDICE

Dados estatísticos

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

=====

Arquivo **TukeyMEA2406**.txt Data 24/06/2014 Hora 10:39:19

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	1.03389	0.51694	1.8731	ns
Resíduo	6	1.65593	0.27599		
Total	8	2.68982			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	5.1433	1.8731	0.2333

MÉDIAS E MEDIDAS Médias de tratamento

1	5.94000 a
2	6.00667 a
3	5.25667 a

dms = 1.31636

MG = 5.73444 CV% = 9.16
Ponto médio = 5.54500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
Estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
Shapiro-Wilk (W) 0.85947 0.09463 Sim

DADOS

6.38 5.93 5.51

6.16 5.93 5.93
4.71 6.16 4.90

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

=====

Arquivo **TukeySab2406.txt** Data 24/06/2014 Hora 10:52:21

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	2.94663	1.47332	4.2019	ns
Resíduo	3	1.05190	0.35063		
Total	5	3.99853			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	3	9.5521	4.2019	0.1349	

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	5.63000	a
2	4.90500	a
3	6.61500	a

dms = 2.46201

MG = 5.71667 CV% = 10.36
Ponto médio = 5.89000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
Estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.91094	0.44261	Sim

DADOS

6.16 5.10 LGMF1254

4.71 5.10 LGMF1255
7.07 6.16 *M.sutura*

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

=====

Arquivo **TUKEYMM2406.txt** Data 24/06/2014 Hora 10:56:55

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	24.71780	12.35890	20.1165	**
Resíduo	6	3.68620	0.61437		
Total	8	28.40400			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	20.1165	0.0022	

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	2.64667 b
2	1.89667 b
3	5.72667 a

dms = 1.96401

MG = 3.42333 CV% = 22.90

Ponto médio = 3.85000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
Estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
Shapiro-Wilk (W) 0.84668 0.06850 Sim

DADOS

1.54 2.40 4.00 LGMF1254

1.54 2.01 2.14 LGMMF1255
6.16 5.30 5.72 *M.sutura*

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.04/01/2014

=====

Arquivo **tukeycitrus2906.txt** Data 29/06/2014 Hora 18:22:11

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2		2.51590	1.25795	8.9971 ns
Resíduo		3	0.41945	0.13982	
Total			5	2.93535	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	3	9.5521	8.9971	0.054	

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	6.85000 a
2	6.91500 a
3	5.51000 a

dms = 1.55468

MG = 6.42500 CV% = 5.82

Ponto médio = 6.40500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
Shapiro-Wilk (W) 0.87992 0.26867 Sim

DADOS

7.30 6.40 LGMF1254

7.00 6.83 LGMF1255
5.51 5.51 *M. sutura*

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.04/01/2014

=====

Arquivo **TukeyBDA2906.txt** Data 29/06/2014 Hora 18:24:56

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	11.20390	5.60195	9.4932	ns
Resíduo	3	1.77030	0.59010		
Total	5	12.97420			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	3	9.5521	9.4932	0.0504	

MÉDIAS E MEDIDAS Médias de tratamento

1	7.67000 a
2	5.75500 ab
3	4.33500 b
dms =	3.19393

MG = 5.92000 CV% = 12.98
Ponto médio = 6.09500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
Shapiro-Wilk (W) 0.90715 0.41794 Sim

DADOS

7.30 8.04 LGMF1254

4.91 6.60 LGMF1255
4.52 4.15 *M. sutura*

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

Arquivo Tukeytemperatura 28°C2906.txt

Data 29/06/2014 Hora 18:39:26

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2		2.96241	1.48121	86.2169 **
Resíduo		12	0.20616	0.01718	
Total		14	3.16857		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	6.9266	86.2169	<0.001	

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	2.72000	b
2	2.06200	c
3	3.14200	a

dms = 0.22099

MG = 2.64133 CV% = 4.96

Ponto médio = 2.64000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal

Shapiro-Wilk (W) 0.88484 0.05606 Sim

DADOS

2.69 2.84 2.69 2.84 2.54
2.01 2.14 2.01 2.14 2.01
3.27 2.95 3.27 3.27 2.95

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

Arquivo tukeytemperatura23°C 2906.txt

Data 29/06/2014 Hora 18:45:44

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

	FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2		2.46161	1.23081	16.0233 **
Resíduo		12	0.92176	0.07681	
Total		14	3.38337		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

	GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	6.9266	16.0233		<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1 3.30600 a
2 2.38600 b
3 2.52400 b

dms = 0.46728

MG = 2.73867 CV% = 10.12

Ponto médio = 2.90500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95332	0.57822	Sim

DADOS

2.99	3.14	3.14	3.80	3.46
2.69	2.01	2.69	2.27	2.27
2.35	2.35	2.79	2.64	2.49

OBSERVAÇÃO

O Assistat não é responsável por resultados inconsistentes de análise de dados que não atendem às exigências da ANOVA. Antes da análise o usuário deve verificar se ela se aplica.

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 dms = Diferença mínima significativa

Apêndice

Composição dos Meios de Cultura

- MEIO MÍNIMO (MM) – PONTECORVO *et al.* 1953

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	5,0 g
pH	6,8
Água destilada	p/ 1.000mL

- MEIO CITROS (STRINGARI, 2009)

Folhas de Citros 28 g

Ágar 15 g

Glicose 20 g

Água destilada 1000mL

- MEIO SABOURAUD

Dextrose: 40 g

Peptona: 10 g

Ágar: 15 g

Água destilada: 1000 ml

- MEIO MEA (*Malt Extract Agar*)

Maltose: 12,75 g

Dextina 2,75 g

Glicerol 2,35 g

Peptona 0,78 g

Agar 15,0 g